

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年11月22日 (22.11.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/88144 A1

(51)国際特許分類7: C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

(YOKOMIZO, Satoru) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6丁目31-17 三青荘 Hyogo (JP). 福地 健 (FUKUCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒673-0866 兵庫県明石市朝霧町3-123 セゾン朝霧304 Hyogo (JP). 小坂田史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県岡山市大安寺東町17-7 Okayama (JP). 松本圭司 (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県西宮市大森町11-33 Hyogo (JP). 高木正道 (TAKAGI, Masamichi) [JP/JP]; 〒183-0051 東京都府中市栄町1丁目31-10 Tokyo (JP). 太田明徳 (OHTA, Akinori) [JP/JP]; 〒331-0063 埼玉県さいたま市プラザ57-2 Saitama (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/04158

(74)代理人: 安富康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(22)国際出願日: 2001年5月18日 (18.05.2001)

(81)指定国(国内): CA, CN, ID, JP, KR, SG, US.

(25)国際出願の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26)国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(30)優先権データ:

特願2000-148726 2000年5月19日 (19.05.2000) JP
特願2000-396955

2000年12月27日 (27.12.2000) JP

特願2001-16929 2001年1月25日 (25.01.2001) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 鎌淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 横溝 聰

[続葉有]

(54)Title: TRANSFORMANT AND PROCESS FOR PRODUCING POLYESTER BY USING THE SAME

(54)発明の名称: 形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

(57)Abstract: A gene encoding copolymerized polyester synthase; a microorganism synthesizing polyester via fermentation with the use of the above gene; and a process for producing polyester by using the above microorganism. More particularly speaking, a gene acting in a host wherein a plastic-like polymer which is degradable by microorganisms in natural environment (soil, river, ocean) can be enzymatically synthesized; a transformant having an improved ability to synthesize a plastic-like polymer by fermentation which is obtained by transforming the above gene; and a process for producing copolymerized polyester by using the above transformant.

(57)要約:

本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境(土中、河川、海中)の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の酵素合成が可能な宿主内で機能する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。

WO 01/88144 A1

WO 01/88144 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

技術分野

5 本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、宿主内で機能し、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を酵素合成する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵
10 合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。

背景技術

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステル
15 を菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P(3HB)と略す）であり、1925年にバシラス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）で最初に発見された。P(3HB)は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしい
20 グリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P(3HB)は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)
25 とからなる共重合体（以下P(3HB-co-3HV)と略す）の製造方法が開示されている。このP(3HB-co-3HV)はP(3HB)に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP(3HB-co-3HV)は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上

しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下P（3HB-co-3HH）と略す）およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP（3HB-co-3HH）の製造方法は、土壤より単離されたアエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P（3HB-co-3HH）の性質に関する研究もなされている（Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)）。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源としてアエロモナス・キャビエを培養し、3HHが11~19mol%のP（3HB-co-3HH）を発酵生産している。このP（3HB-co-3HH）は3HHモル分率の増加にしたがって、P（3HB）の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P（3HB-co-3HV）を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、本製造方法では菌体生産量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマーア生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

P（3HB-co-3HH）を生産するアエロモナス・キャビエよりPHA（ポリヒドロキシアルカン酸）合成酵素遺伝子がクローニングされた（T. Fukui, Y. Doi, *J. Bacteriol.*, vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)、特開平10-108682）。本遺伝子をラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）（旧アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*））に導入した形質転換株を用いてP（3HB-co-3HH）を生産を行った結果、菌体生産性は4g/L、ポリマー含量は30%であった。更に本形質転換株を炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体含量4g/L、ポリマー含量80%が達成された（T. Fukui等 *Appl. Microbiol. Bi*

o t e c n o l . 4 9 , 3 3 3 (1 9 9 8)) 。また、大腸菌等の細菌や植物を宿主とした P (3 H B - c o - 3 H H) の製造方法も開示されている (W O 0 0 / 4 3 5 2 5) 。しかし、本製造法による生産性は記載されていない。

本ポリマー P (3 H B - c o - 3 H H) は 3 H H モル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどの柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法では本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

最近になって、 3 H B の前駆物質であるアセチル C o A を効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステルの生産研究が L e a f らによって行われた (M i c r o b i o l o g y , v o l . 1 4 2 , p p 1 1 6 9 - 1 1 8 0 (1 9 9 6)) 。酵母の一種であるサッカロマイセス・セルビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) にラルストニア・ユートロファのポリエステル合成酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによって P (3 H B) の蓄積 (ポリマー含量 0 . 5 %) を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有する P (3 H B) であった。

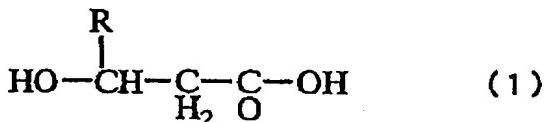
酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。酵母菌体は過去 S i n g l e C e l l P r o t e i n として注目され、ノルマルパラフィンを炭素源とした飼料用菌体生産が研究されたり、調味料としてその核酸成分が利用されてきた。また、ポリマーの前駆物質である a c e t y l - C o A を効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有する P (3 H B - c o - 3 H H) を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

発明の開示

本発明は、上記現状に鑑み、酵母で機能的かつ効率よく発現できるポリエステ

ル合成に関する遺伝子、同遺伝子から成る遺伝子発現カセットを酵母に形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換株を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有する P (3 HB - c o - 3 HH) 等のポリエステルを製造する方法を提供するものである。

- 5 本発明者らは様々な検討を行った結果、下記一般式 (1) に示す 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関する酵素遺伝子であつて、酵母で実質的に遺伝子発現可能な酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに、酵母で実質的に機能するプロモーター、ターミネーターを連結することにより遺伝子発現カセットを作製し、さらに本遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換
10 株を作成し、本形質転換株を培養することにより、その培養物から下記一般式 (1) に示す 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造することに成功した。



- 15 式中、 R は、アルキル基を表す。

すなわち本発明は、酵母に、ポリエステルの合成に関する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種類以上導入されてなることを特徴とする形質転換体である。

- 本発明はまた、上記形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であつて、上
20 記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエス
テルの製造方法である。

ここで、「実質的」とはポリエステル合成に関する遺伝子並びに遺伝子発現カセットの構築に必要なプロモーター、ターミネーター等の遺伝子配列は、遺伝子の機能並びに遺伝子発現に必要な機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に
25 欠失、置換、挿入等の変異が生じてもよいものとする。

さらに本発明は、遺伝暗号 C T G の少なくとも 1 つが、 T T A 、 T T G 、 C T T 、 C T C 、又は C T A に変換されていることを特徴とするポリエステルの合成

に関する酵素遺伝子にも関する。

以下に、本発明の詳細を説明する。

図面の簡単な説明

5 図1は、実施例2（a）においてベクターとして使用したプラスミドpSUT5を示す模式図である。

図2は、実施例2（b）においてベクターとして使用したプラスミドpUTA1を示す模式図である。

10 図3は、実施例2（a）において構築したプラスミドpSUT-phaJを示す模式図である。

図4は、実施例2（a）において構築したプラスミドpSUT-PHA1を示す模式図である。

図5は、実施例2（a）において構築したプラスミドpSUT-PHA2を示す模式図である。

15 図6は、実施例2（b）において構築したプラスミドpUAL1を示す模式図である。

図7は、実施例2（b）において構築したプラスミドpUAL-ORF2を示す模式図である。

20 図8は、実施例2（b）において構築したプラスミドpUAL-ORF3を示す模式図である。

図9は、実施例2（b）において構築したプラスミドpUTA-ORF23を示す模式図である。

図10は、実施例2（a）のプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。

25 図11は、実施例2（b）プラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。

図12は、実施例3において製造されたポリエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した結果である。

図13は、実施例3において製造されたポリエステルのNMR分析のチャート

である。

図14は、実施例3において製造されたポリエステルのIR分析のチャートである。

図15は、実施例4において製造されたポリエステルのNMR分析チャートである。

発明を実施するための最良の形態

(1) 宿主

使用する酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されているアシクロコニディウム属（*Aciculocandidium*属）、アンブロシオザイマ属（*Ambrosiozyma*属）、アルスロアスカス属（*Arthroascus*属）、アルキシオザイマ属（*Arxiomyza*属）、アシュビア属（*Ashbya*属）、バブジエビア属（*Babjevia*属）、ベンシングトニア属（*Bensingtonia*属）、ボトリオアスカス属（*Botryoascus*属）、ボトリオザイマ属（*Botryozyma*属）、ブレッタノマイセス属（*Brettanomyces*属）、ビュレラ属（*Bullera*属）、ビュレロマイセス属（*Bulleromyces*属）、キャンディダ属（*Candida*属）、シテロマイセス属（*Citeromyces*属）、クラビスピラ属（*Clavispora*属）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*属）、シストフィロバシディウム属（*Cystofilobasidium*属）、デバリオマイセス属（*Debaromyces*属）、デッカラ属（*Dekkara*属）、ディポダスコプシス属（*Dipodascopsis*属）、ディポダスカス属（*Dipodascus*属）、エニエラ属（*Eniella*属）、エンドマイコプセラ属（*Endomycopseila*属）、エレマスカス属（*Eremascus*属）、エレモセシウム属（*Eremothecium*属）、エリスロバシディウム属（*Erythrobasiidium*属）、フェロマイセス属（*Fellomyces*属）、フィロバシディウム属（*Filobasidium*属）、ガラクトマイセス属（*Galactomyces*属）、ゲオトリクム属（*Geotrichum*属）、ガイラーモンデ

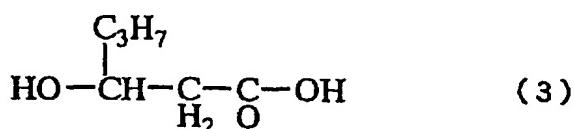
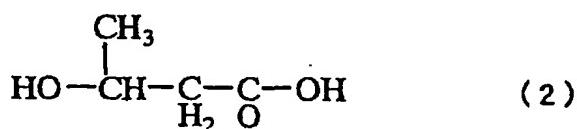
ラ属 (*Guilliermondella* 属), ハンセニアスpora属 (*Hanseniaspora* 属), ハンセヌラ属 (*Hansenula* 属), ハセガワエア属 (*Hasegawaea* 属), ホルターマンニア属 (*Holtermannia* 属), ホルモアスカス属 (*Hormoascus* 属), ハイフォピキア属 (*Hypopichia* 属), イサットヘンキア属 (*Issatchenkia* 属), クロエケラ属 (*Kloeckera* 属), クロエケラスpora属 (*Kloeckeraspora* 属), クルイベロマイセス属 (*Kluyveromyces* 属), コンドア属 (*Kondoa* 属), クライシア属 (*Kuraishia* 属), クルツマノマイセス属 (*Kurtzmanomyces* 属), ロイコスポリ
5 ディウム属 (*Leucosporidium* 属), リポマイセス属 (*Lipomyces* 属), ロデロマイセス属 (*Lodderomyces* 属), マラセジア属 (*Malassezia* 属), メトシュニコヴィア属 (*Metschnikowia* 属), ムラキア属 (*Mrakia* 属), マイクソザイマ属 (*Myxozyma* 属), ナドソニア属 (*Nadsonia* 属), ナカザワエア属 (*Nakazawaea* 属), ネマトスpora属 (*Nematospora* 属), オガタエア属 (*Ogataea* 属), オースポリディウム属 (*Oosporidium* 属),
10 パチソレン属 (*Pachysolen* 属), ファチコスpora属 (*Phactichospora* 属), フアフィア属 (*Phaffia* 属), ピキア属 (*Pichia* 属), ロドスپリディウム属 (*Rhodosporidium* 属),
15 ロドトルラ属 (*Rhodotorula* 属), サッカロマイセス属 (*Saccharomyces* 属), サッカロマイコードス属 (*Saccharomyces* 属), サッカロマイコプシス属 (*Saccharomyces* 属), サイトエラ属 (*Saitoella* 属), サカグチア属 (*Sakaguchi* 属), サターノスpora属 (*Saturnospora* 属), シゾプラストスボ
20 リオン属 (*Schizoblastosporion* 属), シゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces* 属), シュワニオマイセス属 (*Schwanniomyces* 属), スポリディオボラス属 (*Sporidiobolus* 属), スポロボロマイセス属 (*Sporobolomyces* 属),
25 スポロパキデミア属 (*Sporopachydermia* 属), ステファノアス

カス属 (*Stephanoascus* 属) , ステリグマトマイセス属 (*Sterigmatomyces* 属) , ステリグマトスボリディウム属 (*Sterigmatosporidium* 属) , シンビオタフリナ属 (*Symbiotaphrina* 属) , シンボディオマイコプシス属 (*Sympodiomycopsis* 属) , シンボディオマイコプシス属 (*Sympodiomycopsis* 属) , トルラスピラ属 (*Torula spora* 属) , トリコスボリエラ属 (*Trichosporiella* 属) , トリコスボロン属 (*Trichosporon* 属) , トリゴノプシス属 (*Trigonopsis* 属) , ツチヤエア属 (*Tsuchiyaea* 属) , ウデニオマイセス属 (*Udeniomyces* 属) , ワルトマイセス属 (*Waltomyces* 属) , ウィカーハミア属 (*Wickerhamia* 属) , ウィカーハミエラ属 (*Wickerhamiella* 属) , ウィリオプシス属 (*Williopsis* 属) , ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma* 属) , ヤロウィニア属 (*Yarrowia* 属) , ザイゴアスカス属 (*Zygoascus* 属) , ザイゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces* 属) , ザイゴウイリオプシス属 (*Zygowilliopsis* 属) 又はザイゴザイマ属 (*Zygozyma* 属などの酵母を使用することができる。

また、本発明の形質転換体において用いられる酵母として、キャンディダ・マルトーサ (*Candida malosa*) 、ヤロウィニア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) が好ましいが、特にキャンディダ・マルトーサが好ましい。

(2) ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されないが、細菌由来の酵素をコードする遺伝子が好ましい。具体的には、上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が好ましく、下記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記式 (3) で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) の合成に関与する酵素遺伝子であることがより好ましい。



上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関する酵素遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平1
 5 0-108682号公報に記載されているポリエステル合成酵素遺伝子を用いる
 ことができる。上記ポリエステル合成酵素遺伝子としては、例えば、PHA合成
 酵素遺伝子があげられる。また、本ポリエステル合成酵素遺伝子と共にポリエス
 テル合成に関する酵素遺伝子を用いても良い。これらの酵素遺伝子としては、
 たとえば、β酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-
 10 ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ
 遺伝子(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))や、アセチルCoAを二量化してモノマーである3-ヒドロキシブチリルCoAを合成するβケ
 トチオラーゼ遺伝子、NADPH依存性アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子(15
 15 Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26)
 15298-15303 (1989))などが挙げられる。

上記宿主酵母の中には遺伝暗号読みとりに異常を示す場合がある。例えばキャンディダ・シリンドラセア(Candida cylindracea)(Y. Kawaguchi et al, Nature 341 164-166 (1989))やキャンディダ・マルトーサ(H. Sugiyama et al, Yeast 11 43-52 (1995))では遺伝暗号CTGが、ロイシンではなくセリンに翻訳される特殊な酵母である。このような酵母では、ポリエステル合成に関する酵素遺伝子を発現させる場合、遺伝暗号の読みとり異常が生じることから、当該酵素のアミノ酸配列の異なった酵素が生産されることがある
 25 その結果、当該酵素の機能が十分発揮できない。

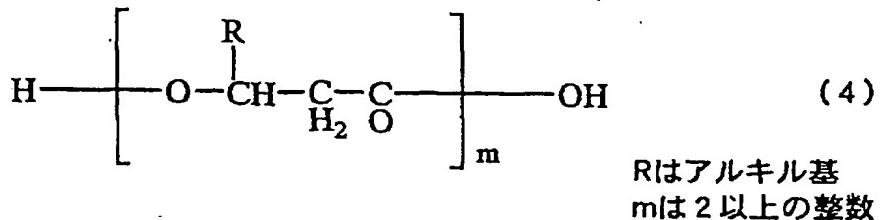
このような現象は、予め遺伝子内に含まれる遺伝暗号 C T G をロイシンに対応する他の遺伝暗号 (T T A , T T G , C T T , C T C , C T A) に改変した遺伝子を使用することによって避けることができる。

また、酵母を含む生物の遺伝暗号解析の結果、遺伝暗号の使用頻度は生物によつて大きく異なることが明らかになっている。すなわち、複数ある同一アミノ酸を指定する遺伝暗号のうち使用される遺伝暗号は生物によって偏りが認められ、使用頻度の高い遺伝暗号から成る遺伝子の翻訳効率が高いことが指摘されている。例えばアエロモナス・キャビエの P H A 合成酵素遺伝子や (R) 体特異的エノイル C o A ヒドロキシ化酵素遺伝子の G C 含量はそれぞれ 67. 16%、65. 77%であるが、キャンディダ・マルトーサで現在までに報告されている酵素、例えばホスホグリセリン酸キナーゼでは 39. 55% また A L K 2 -A では 35. 67% である。したがって、例えばポリエステル合成に関する遺伝子をキャンディダ・マルトーサにおいて効率よく発現させるためには、前記の遺伝暗号 C T G を他のロイシン対応遺伝暗号に改変することに加えて、キャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高い遺伝暗号に改変した当該遺伝子を使用することが好ましい。

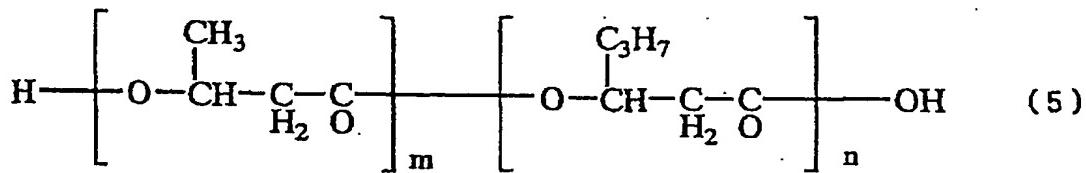
本ポリエステル合成に関する酵素遺伝子は、遺伝暗号に読みとり異常を示さない酵母では、前記酵素遺伝子をそのまま利用しても良いし、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に改変した遺伝子を利用しても良い。また、遺伝暗号に読みとり異常を示す酵母では、前記酵素遺伝子の C T G コドンを T T A , T T G , C T T , C T C または C T A に改変した遺伝子を利用しても良い。さらに、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に改変した遺伝子を利用しても良い。例えば、キャンディダ・マルトーサを宿主とした場合、本ポリエステル合成に関する遺伝子として配列番号 3 、配列番号 4 に示される遺伝子を利用することができる。上記遺伝子の塩基配列は、本ポリエステルの合成に関する酵素を生産するものであれば、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じてもよい。

また、上記 P H A 合成酵素によって合成されるポリエステルは、上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるものであり、下記一

般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。



5



m, nは1以上の整数

(3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の5'上流にプロモーター、UAS等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結が必要である。これらのDNA配列は酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてよい。

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターは、ポリエステルの生産に使用する生物において機能するものであるものが好ましい。

以下、本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセット構築の例として、(a)宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合、(b)宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合について具体的に説明する。

20

(a)宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合

宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合は、使用するプロモーター、ターミネーターは、ヤロウィア・リポリティカ由来であることが好ましい。より好ましくは、ヤロウィア・リポリティカALK3由来のプロモーター、ヤロウイア・リポリティカXRP2由来のターミネーターであることが好ましい。なお、上記プロモーター及び／又はターミネーターのDNA配列は、ヤロウイア・リポリティカで機能する配列であれば、1つ若しくは複数の塩基が欠失、置換及び／又は、付加されたDNA配列であってもよい。

構築に用いられるベクターは、大腸菌において自立増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自立増殖可能な領域を合わせ持っていてもよい。酵母において自立増殖できるベクターでは、菌体内に保持される。また、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込むこともできる。ヤロウイア・リポリティカにおいては、自立増殖可能なpSAT4やpSUT5を用いることができる（1997年度 東京大学大学院、博士論文「酵母Yarrowia lipolyticaのn-アルカン誘導型チトクロームP450遺伝子群に関する研究」飯田敏也）。

上記酵母においては、ポリエステルの合成に関する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）由来の遺伝子であることが好ましく、例えば、*A. caviae*由来のPHA合成酵素遺伝子（以下phaCと略す）（配列番号1）、または、phaCおよびβ酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである（R）-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する（R）体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子（以下phaJと略す）（T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)）（配列番号2）が好適に用いられる。

これらの構造遺伝子のそれぞれ5'上流にヤロウイア・リポリティカALK3遺伝子のプロモーターALK3p（配列番号5）（GenBank AB010390）を連結することができる。

プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いたプライマー配列を配列番号8から

配列番号 1 4 に示す。PCR の条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いててもよい。

プロモーター部分は配列番号 5 を鋳型にして配列番号 8 と配列番号 9、配列番号 9 と配列番号 10 を用いて、それぞれ 5' 末端が XbaI 、 3' 末端が NdeI の ALK3X と 5' 末端が SacII 、 3' 末端が NdeI の ALK3S を作製することができる。 phaC は配列番号 1 を鋳型にして配列番号 11 と配列番号 12 とを用いて、 5' 末端が NdeI 、 3' 末端が PstI である約 100bp の断片を作製することができる。これに残りの PstI-BamHI 約 1700bp を結合して、 5' 末端が NdeI 、 3' 末端が BamHI である完全長の phaC を作製することができる。 phaJ は配列番号 2 を鋳型にして配列番号 13 と配列番号 14 とを用いて、 5' 末端が NdeI 、 3' 末端が KpnI である phaJ を作製することができる。ベクターにはプラスミド pSUT5 (図 1 、配列番号 19) と pSUT5 の NdeI サイトを配列番号 20 のリンカー-DNA を用いて、 XbaI サイトに変更したベクター pSUT6 とを使用することができる。 pSUT6 のマルチクローニングサイトの SacII 、 KpnI サイトに ALK3S と phaJ とを結合し、プラスミド pSUT-phaJ (図 3) を構築することができる。次に pSUT5 のマルチクローニングサイトの XbaI 、 BamHI サイトに ALK3X と phaC とを結合し、プラスミド pSUT-PHA1 (図 4) を構築することができる。

さらにプラスミド pSUT-phaJ から SacII と XbaI とを用いて、 ALK3S と phaJ と下流にあるターミネーターとと一緒に切り出し、プラスミド pSUT-PHA1 の SacII 、 XbaI サイトに結合したプラスミド pSUT-PHA2 (図 5) の二種類の組換え用プラスミドを構築することができる。

以上のように、酵母ヤロウィア・リポリティカにおいて上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

(b) 宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合

宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合は、使用するプロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサで機能するものであることが好ましく、キャンディダ・マルトーサ由来であることがより好ましい。さらに好ましくは、キャンディダ・マルトーサALK1由来のプロモーター及びターミネーターを利用する。なお、上記プロモーター及び／又はターミネーターのDNA配列は、キャンディダ・マルトーサで機能する配列であれば、1つ若しくは複数の塩基が欠失、置換及び／又は、付加されたDNA配列であってもよい。

構築に用いられるベクターとして、上記(a)で言及したものと同様のものが挙げられる。キャンディダ・マルトーサにおいては、自立増殖可能なpUTU1を用いることができる(M. Ohkuma, et al J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953 (1998))。

宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合は、ポリエステルの合成に関する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の酵素と同じアミノ酸配列をコードする遺伝子であることが好ましく、例えば、アエロモナス・キャビエの由来のPHA合成酵素アミノ酸配列と同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトーサにおいてコードする遺伝子(以下ORF2と略す、配列番号3)、または、ORF2及びβ酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼと同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトーサにおいてコードする遺伝子(以下ORF3と略す、配列番号4)が好適に用いられる。(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))

これらの構造遺伝子のそれぞれ5'上流にキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子のプロモーターALK1p(配列番号6)、3'下流にターミネーターALK1t(配列番号7)(GenBank D00481)(M. Takagi, et al Agric. Biol. Chem., vol. 5, 2217-2226 (1989))を連結することができる。

プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いるプライマー配列

は配列番号15から配列番号18に示す。PCRの条件は(a)で上述した条件を用いることができる。

プロモーター部分は配列番号6を鋳型にして配列番号15と配列番号16を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製することができる。⁵ターミネーター部分は配列番号7を鋳型にして配列番号17と配列番号18を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製することができる。ベクターにはpUTU1とキャンディダ・マルトーサのAde1遺伝子(配列番号21、GenBank D00855)(S. Kawai, et al., Agric. Biol. Chem., vol. 55, 10 59-65 (1991))を用いて、マーカー遺伝子をUra3からAde1に変更したベクターpUTA1(図2)を使用することができる。pUCNT(WO94/03613に記載)のPvuII、NdeIサイトにALK1pを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1(図6)を構築することができる。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2(図7)を構築することができる。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3(図8)を構築することができる。

つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築することができる。

さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図9)を構築することができる。

以上のことにより、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式(1)で示されるアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

(4) 形質転換体の作製

酵母にポリマー合成に関する遺伝子発現カセット組換えベクターを導入するためには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (Lederberg, E. M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻、1.8.4 頁、1994年) 等を用いることができる。また、Fast Track™-Yeast Transformation Kit_{SM} (Geno Technology) のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

例えば、宿主として、ヤロウィア・リポリティカCXAU1株 (T. Iida, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998)) を用いることができる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関する遺伝子発現カセットを形質転換し、pSUT-PHA1を有するヤロウィア・リポリティカPHA1株と、pSUT-PHA2を有するヤロウィア・リポリティカPHA2株を作製することができる。

また宿主として、キャンディダ・マルトーサCHA1株 (S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991)) を用いることもできる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関する遺伝子発現カセットを形質転換し、pUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサCHA1株を作製することができる。

(5) ポリエステルの製造

本発明のポリエステルの製造方法では、本発明の形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取する。

本発明の形質転換体を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでもよい。また、プロモーターの発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すればよい。誘導物質が主要炭素源である場合もある

。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

5 炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュークロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。例えば、キャンディダ・マルトーサの培養及びヤロウィア・リポリティカの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリバーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リバーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

10

15

また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸やn-パラフィン等を用いた場合、上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

20 その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチニ酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロ

ロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

本発明のポリエステルの製造方法は、上述のような構成からなるので、上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを生産性良く製造することができる。

また、上述したプラスミドpSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するヤロウィア・リポリティカ組み換え株、プラスミドpUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサ組み換え株等を作製し、培養する方法により、上記一般式（2）で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記一般式（3）で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP（3HB-co-3HH）を製造することができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

20 (実施例1) ポリエステル合成に関与する遺伝子

(a) 宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用した場合

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャビエの由来のPHA合成酵素遺伝子（phaC；配列番号1）と、 β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子（phaJ；配列番号2）

(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)) を使用した。

(b) キャンディダ・マルトーサを宿主として使用した場合

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャビエの由

来のPHA合成酵素と、 β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである

(R) - 3 - ヒドロキシアシルCoAに変換する (R) 体特異的エノイルCoA
ヒドラターゼ (T. Fukui, et al. FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69 - 75 (1999)) のアミ
5 ノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。

キャンディダ・マルトーサはCTGコドンをロイシンではなくセリンに翻訳する酵母である。このため、キャンディダ・マルトーサにおいて使用するにあたり、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。各アミノ酸に対応するコドンは キャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択した。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版) を参考にした。具体的には、メチオニン、トリプトファンは、それぞれをATG、TGGを割り当てた。フェニルアラニンでは、TTTとTTCを交互に割り当てた。ロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるCTCをTTA、CTGをTTGにそれぞれ変換し、TTAとTTGはそのまま用いた。イソロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるATCをATT、ATAをATCにそれぞれ変換し、ATTはそのまま用いた。バリンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるGTCをGTT、GTAをGTTにそれぞれ変換し、GTCとGTTはそのまま用いた。セリンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるAGCをTCT、TCAをTCT、TCGをTCTにそれぞれ変換し、TCCとTCTはそのまま用いた。プロリンでは、対応するコドンを全てCCAに変換した。スレオニンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるACCをACT、ACGをACC、ACAをACCにそれぞれ変換し、ATCはそのまま用いた。アラニンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるGCCをGCT、GCGをGCC、GCAをGCTにそれぞれ変換し、GCTはそのまま用いた。チロシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるチロシンコドンに対して、TAT、TACを交互に割り当てた。終始コドンは、TAAを用いた。ヒスチジンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるヒスチジンコドンに対して、CAT、CACを交互に割り当てた。グル

タミンでは、対応するコドンを全て CAA に変換した。アスパラギンでは、対応するコドンに対して AAT と AAC を交互に割り当てた。リジンでは、対応するコドンを全て AAA に変換した。アスパラギン酸では、対応するコドンをすべて GAT に変換した。グルタミン酸では、対応するコドンを全て GAA に変換した
5。システィンでは、対応するコドンを全て TGT に変換した。アルギニンでは、対応するコドンを全て AGA に変換した。グリシンでは、対応するコドンを全て GGT に変換した。さらにアエロモナス・キャビエの由来の PHA 合成酵素 DNA 配列において、2箇所の KpnI 部位を作成するために、969番目の T を C 、1449番目の T を C に変換した。これらの置換によって当該遺伝子のアミノ酸配列構造は変更されない。
10

このようにして PHA 合成酵素遺伝子 (ORF2 ; 配列番号 3) と (R) 体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子 (ORF3 ; 配列番号 4) を設計し、これらの配列を元に ORF2 と ORF3 を全合成した。

15 (実施例 2) 組換えプラスミドおよび組換え株の構築

(a) 宿主としてヤロウイア・リポリティカを使用した場合

上記遺伝子がヤロウイア・リポリティカで発現するように、それぞれの 5' 上流にヤロウイア・リポリティカの A1k3 遺伝子のプロモーター ALK3p (配列番号 5) (GenBank AB010390) を連結することにした。

20 プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR 法を利用した。PCR に用いたプライマー配列を配列番号 8 から配列番号 14 に示す。PCR の条件は 94°C 1 分、55°C 2 分、72°C 3 分を 1 サイクルとし、これを 25 回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造 (株) の ExTaq を使用した。プロモーター部分は配列番号 5 を鋳型にして配列番号 8 と配列番号 9、配列番号 9 と配列番号 10 を用いて、それぞれ 5' 末端が XbaI 、 3' 末端が NdeI の ALK3X と 5' 末端が SacII 、 3' 末端が NdeI の ALK3S とを作製した。

p h a C は配列番号 1 を鋳型にして配列番号 11 と配列番号 12 とを用いて、5' 末端が NdeI 、 3' 末端が PstI である約 100bp の断片を作製し

た。これに残りの Pst I—BamHI 断片約 1700 bp を結合して、5' 末端が Nde I、3' 末端が BamHI である完全長の pha C を作製した。pha J は配列番号 2 を鋳型にして配列番号 13 と配列番号 14 とを用いて、5' 末端が Nde I、3' 末端が KpnI である pha J を作製した。

5 ベクターにはプラスミド pSUT5 (図 1、配列番号 19) と pSUT5 の Nde I サイトを配列番号 20 のリンカーDNAを用いて、Xba I サイトに変更したベクター pSUT6 とを使用した。pSUT6 のマルチクローニングサイトの Sac II、KpnI サイトに ALK3S と pha J j とを結合し、プラスミド pSUT-pha J (図 3) を構築した。次に pSUT5 のマルチクローニングサイトの Xba I、BamHI サイトに ALK3X と pha C とを結合し、プラスミド pSUT-PHA1 (図 4) を構築することができる。

10 10

さらにプラスミド pSUT-pha J から Sac II と Xba I とを用いて、ALK3S と pha J と下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、同 DNA をプラスミド pSUT-PHA1 の Sac II、Xba I サイトに挿入することによりプラスミド pSUT-PHA2 (図 5) を構築した。すなわち、このようにして二種類の組換え用プラスミド pSUT-PHA1 と pSUT-PHA2 を構築した。以上の方針により、酵母ヤロウィア・リポリティカにおいて上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図 20 を図 10 に示した。

宿主にはヤロウィア・リポリティカ CXAU1 株 (T. Iida, et al 1 Yeast, 14, 1387-1397 (1998)) を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM} (Geno Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.6 7w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid、2w/v% グルコース、24mg/L アデニン塩酸塩、2w/v% 寒天) を使用して組換え株を取得した。

(b) キャンディダ・マルトーサを宿主として使用した場合

上記ORF 2、ORF 3がキャンディダ・マルトーサで発現するように、それぞれの5' 上流にキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子のプロモーターALK1p（配列番号6、GenBank D00481）を、3' 下流にキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子のターミネーターALK1t（配列番号7）を連結することにした。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、PCR法を利用した。PCRに用いたプライマー配列を配列番号15から配列番号18に示す。PCRの条件は94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造（株）のExTaqを使用した。プロモーター部分は配列番号6を鋳型にして配列番号15と配列番号16を用いて、5'末端がSaiI、3'末端がNdeIのALK1pを作製した。ターミネーター部分は配列番号7を鋳型にして配列番号17と配列番号18を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製した。最終的にORF2とORF3を連結するベクターにはpUC19にキャンディダ・マルトーサの自己複製領域(ARS)（GenBank D29758）およびURA3遺伝子（GenBank D12720）を連結したpUTU（M. Ohkuma, et al., J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953 (1998)）とキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子（配列番号21、Genbank D00855）を用いて、マーカー遺伝子をUra3からAde1に変更したベクターであるpUTA1（図2）を使用した。pUTA1は、pUTU1からXbaIを用いてURA3遺伝子を除去し、これにSaiIを用いて切り出したADE1遺伝子断片を接続し構築した。

pUCNT（WO94/03613に記載）のPvuII、NdeIサイトにALK1pを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1（図6）を構築した。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2（図7）を構築した。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1t

のNde I、Hind IIIサイトにORF 3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF 3(図8)を構築した。

つぎに、プラスミドpUAL-ORF 2からEco T 22 Iを用いて、ORF 2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA1のPst Iサイトに結合し、pUTA-ORF 2を構築した。さらに、pUAL-ORF 3からSal Iを用いてORF 3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA-ORF 2のSal Iサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF 23(図9)を構築した。以上のように、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図を図11に示した。

宿主にはキャンディダ・マルトーサCHA1株(S. Kawai, et al., Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65(1991))を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM}(Geno Technology)を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート(0.67w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid、2w/v%グルコース、24mg/L ヒスチジン、2w/v%寒天)を使用して組換え株を取得した。

20

(実施例3) ヤロウイア・リポリティカ組換え株を用いたP(3HB-co-3HH)の生産

プラスミドpSUT5、pSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するヤロウイア・リポリティカ組換え株を次のように培養した。前培地はYPD培地(1w/v% Yeast-extract、2w/v% Bacto-Pep-ton、2w/v%グルコース)を使用した。ポリエステル生産培地には1/4YPD培地(0.25w/v% Yeast-extract、0.5w/v% Bacto-Pep-ton)とミネラル培地(0.7w/v% KH₂PO₄、1.3w/v% (NH₄)₂HPO₄、0.5w/v% プロエキスAP-1

2 (播州調味料)、0.04 w/v%アデニン、1 ppmチアミン塩酸塩、1 v/v%微量金属塩溶液 (0.1 N 塩酸に 8 w/v% Mg SO₄ · 7 H₂O、0.6 w/v% Zn SO₄ · 7 H₂O、0.9 w/v% Fe SO₄ · 7 H₂O、0.05 w/v% Cu SO₄ · 5 H₂O、0.1 w/v% Mn SO₄ · 6 - 7 H₂O、1 w/v% NaCl)) にパーム油を 2 w/v% を添加したものを使用した。

各組換え株のグリセロールストック 100 μl を 100 ml の前培地が入った 500 ml 坂口フラスコに接種して 20 時間培養し、500 mL の生産培地を入れた 2 L 坂口フラスコに 1 v/v% 接種した。これを培養温度 30 °C、振盪速度 120 rpm、培養時間は、YPD 培地で 24 時間、ミネラル培地で 72 時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを 100 ml 添加し一晩攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで 1 - 2 ml にまで濃縮し、濃縮液に 10 ml のヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

得られたヘキサン不溶物約 2 mg に 500 μl の硫酸-メタノール混液 (1 : 85) と 500 μl のクロロホルムとを添加して密栓し、100 °C で 140 分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに 0.3 g の炭酸水素ナトリウムを添加し、中和した。これに 1 ml のジイソプロピルエーテルを添加して攪拌機を用いて攪拌した。遠心分離して有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所 GC-17A、キャピラリーカラムは GL サイエンス社製 NEUTRA BOND-1 (カラム長 25 m、カラム内径 0.25 mm、液膜厚 0.4 μm) を用いた。温度条件は、初発温度 100 °C から 8 °C/分 の速度で昇温した。得られた分析結果を表 1 に、またその時のサンプル (3) のチャートを図 12 に示す。また、得られたヘキサン不溶物の NMR 分析 (JEOL、JNM-EX 400)、IR 分析 (島津製作所、D

R-800) も行った。その一例としてサンプル(6)の結果を図13、図14に示す。

表1 培養および分析結果

サンプル	培地	菌株	菌体量 (g/L)	ポリマー蓄積量 (wt%)	3HH分率 (mol%)
(1)	1/4YP培地コントロール		3.56	8.9×10^{-2}	
(2)		PHA1株	3.65	1.9×10^{-1}	
(3)		PHA2株	3.43	2.6×10^{-1}	15(GC測定)
(4)	ミネラル培地 コントロール		0.15	6.7×10^{-2}	
(5)		PHA1株	0.19	1.4×10^{-1}	
(6)		PHA2株	0.17	1.8	27(NMR測定)

この結果から、酵母ヤロウィア・リポリティカを用いて共重合ポリエステルP
5 (3HB-co-3HH) が生産できることがわかった。

また、酵母にもごく僅かながらポリマーが存在することがわかった。

(実施例4) キャンディダ・マルトーサ組換え株を用いたP(3HB-co-3HH)の生産

10 プラスミドpUTA1, pUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサ組換え株を次のように培養した。前培地はYNB培地(0.67w/v%Yeast Nitrogen base without amino acid)に1w/v%カザミノ酸、2w/v%パーム油添加した培地を使用した。ポリエ斯特爾生産培地はYNB培地に1w/v%カザミノ酸を添加し、炭素源として①2w/v%パーム油、②2w/v%ヤシ油、③2w/v%テトラデカン、④2w/v%ヘキサデカンを添加した培地を使用した。

各組換え株のグリセロールストック100μlを50mlの前培地が入った500ml坂口フラスコに接種して20時間培養し、500mLの生産培地を入れた2L坂口フラスコに10v/v%接種した。これを培養温度30℃、振盪速度120rpm、培養時間は72時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを100ml添加し一晩攪拌して抽

出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで 1 - 2 m l にまで濃縮し、濃縮液に 1 0 m l のヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

その結果、プラスミド p U T A - O R F 2 3 を導入した組換え株をヤシ油、テトラデカン、ヘキサデカンで培養したものに白色沈殿が見られた（表 2）。ヤシ油で培養したときに得られたヘキサン不溶物のNMR分析（J E O L、J N M - E X 4 0 0）の結果を表 2、図 1 5 に示す。

表2 組換え株培養結果

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマーの蓄積
バーム油	12.5	-
ヤシ油	10.3	++
テトラデカン	4.4	+
ヘキサデカン	3.6	+

この結果から、酵母キャンディダ・マルトーサを用いて共重合ポリエステル P
10 (3 H B - c o - 3 H H) が生産できることがわかった。

産業上の利用可能性

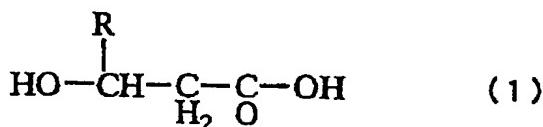
本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式 (1) で示される
3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母を用い
15 て生産することが可能となった。

請求の範囲

1. 酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種類以上導入されてなることを特徴とする形質転換体。

5

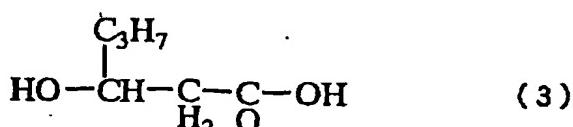
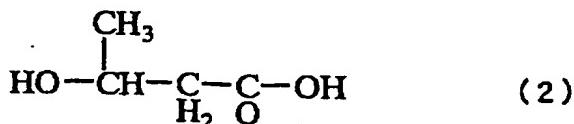
2. ポリエステルは、下記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項1記載の形質転換体。



10 式中、Rは、アルキル基を表す。

3. ポリエステルは、下記式（2）で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式（3）で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP（3HB-co-3HH）である請求項1または2記載の形質転換体。

15



4. 酵母がアシクロコニディウム属、アンブロシオザイマ属、アルスロアスカス属、アルキシオザイマ属、アシュビア属、バブジエビア属、ベンシングトニア属、ボトリオアスカス属、ボトリオザイマ属、ブレッタノマイセス属、ビュレラ属、ビュレロマイセス属、キャンディダ属、シテロマイセス属、クラビスピラ属、クリプトコッカス属、シストフィロバシディウム属、デバリオマイセス属、デッカラ属、ディポダスコプシス属、ディポダスカス属、エニエラ属、エン

ドマイコプセラ属、エレマスカス属、エレモセシウム属、エリスロバシディウム属、フェロマイセス属、フィロバシディウム属、ガラクトマイセス属、ゲオトリクム属、ガイラーモンデラ属、ハンセニアスピラ属、ハンセヌラ属、ハセガワエア属、ホルターマンニア属、ホルモアスカス属、ハイフォピキア属、イサット
5 ヘンキア属、クロエケラ属、クロエケラスピラ属、クルイベロマイセス属、コンドア属、クライシア属、クルツマノマイセス属、ロイコスピリディウム属、リポマイセス属、ロデロマイセス属、マラセジア属、メトシュニコウイア属、ムラキア属、マイクソザイマ属、ナドソニア属、ナカザワエア属、ネマトスピラ属、オガタエア属、オースポリディウム属、パチソレン属、ファチコスピラ属、ファフ
10 ィア属、ピキア属、ロドスピリディウム属、ロドトルラ属、サッカロマイセス属、サッカロマイコーデス属、サッカロマイコプシス属、サイトエラ属、サカグチア属、サターノスピラ属、シゾブラストスピリオン属、シゾサッカロマイセス属、シユワニオマイセス属、スピリディオボラス属、スピロボロマイセス属、スピロパキデミア属、ステファノアスカス属、ステリグマトマイセス属、ステリグ
15 マトスピリディウム属、シンビオタフリナ属、シンポディオマイセス属、シンポディオマイコプシス属、トルラスピラ属、トリコスピリエラ属、トリコスピロン属、トリゴノブシス属、ツチャエア属、ウデニオマイセス属、ワルトマイセス属、
20 ウィカーハミア属、ウィカーハミエラ属、ウィリオブシス属、ヤマダザイマ属、ヤロウイア属、ザイゴアスカス属、ザイゴサッカロマイセス属、ザイゴウイリオブシス属又はザイゴザイマ属である請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換体。

5. 酵母がヤロウイア・リポリティカである請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換体。

25

6. 酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項1～4記載のいずれか1項に記載の形質転換体。

7. ポリエステルの合成に関する酵素遺伝子発現カセットが、酵母で機能す

るプロモーター、ターミネーターからなる請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

8. プロモーター、ターミネーターがヤロウィア・リポリティカ由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

9. プロモーターがヤロウィア・リポリティカのALK 3 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

10 10. ターミネーターがヤロウィア・リポリティカのXPR 2 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

11. プロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサ由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

15 12. プロモーターがキャンディダ・マルトーサのALK 1 由来である請求項 7 又は 11 に記載の形質転換体。

13. ターミネーターがキャンディダ・マルトーサのALK 1 由来である請求項 7 又は 11 に記載の形質転換体。

14. ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

25 15. ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素遺伝子、または、PHA合成酵素遺伝子および (R) 体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子である請求項 1～13 に記載の形質転換体。

16. 前記 PHA 合成酵素遺伝子は配列番号 3 に示す塩基配列からなり、(R) 体特異的エノイルCoA ヒドラターゼ遺伝子は配列番号 4 に示す塩基配列からなる請求項 15 に記載の形質転換体。

5 17. 請求項 1 ~ 16 記載のいずれか 1 項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

18. 遺伝暗号 CTG の少なくとも 1 つが、TTA、TTG、CTT、CTC、
10 又は CTA に変換されていることを特徴とするポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

19. 細菌由来の酵素をコードする請求項 18 記載のポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

15

20. 前記細菌がアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) である請求項 19 記載のポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

21. アエロモナス・キャビエ由来の酵素遺伝子が PHA 合成酵素遺伝子又は
20 (R) 体特異的エノイルCoA ヒドラターゼ遺伝子である請求項 20 に記載のポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

22. 前記 PHA 合成酵素遺伝子が配列番号 3 に示す塩基配列からなる請求項 21 に記載のポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

25

23. 前記 (R) 体特異的エノイルCoA ヒドラターゼ遺伝子が配列番号 4 に示す塩基配列からなる請求項 21 に記載のポリエステルの合成に関する酵素遺伝子。

1/11

図 1

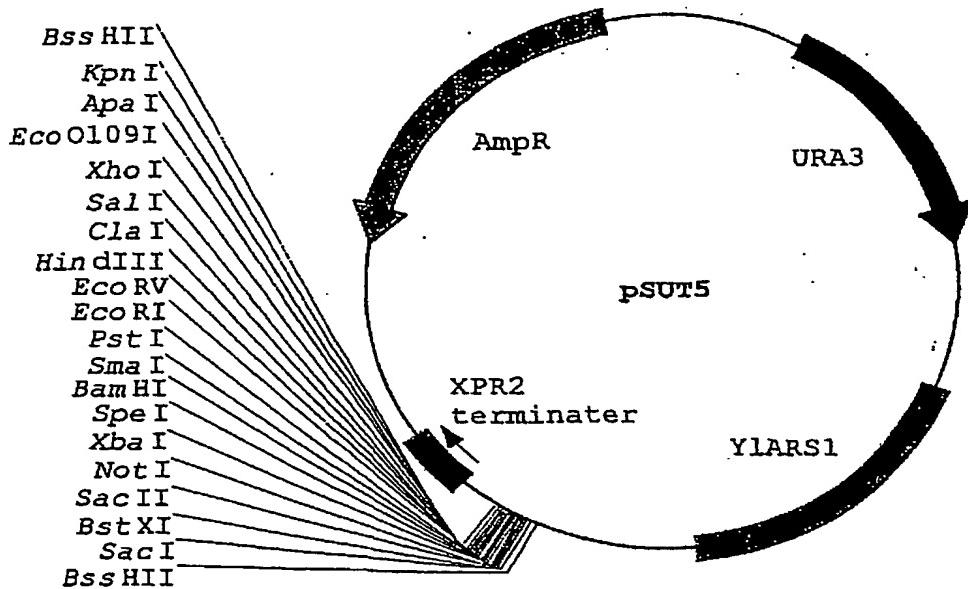
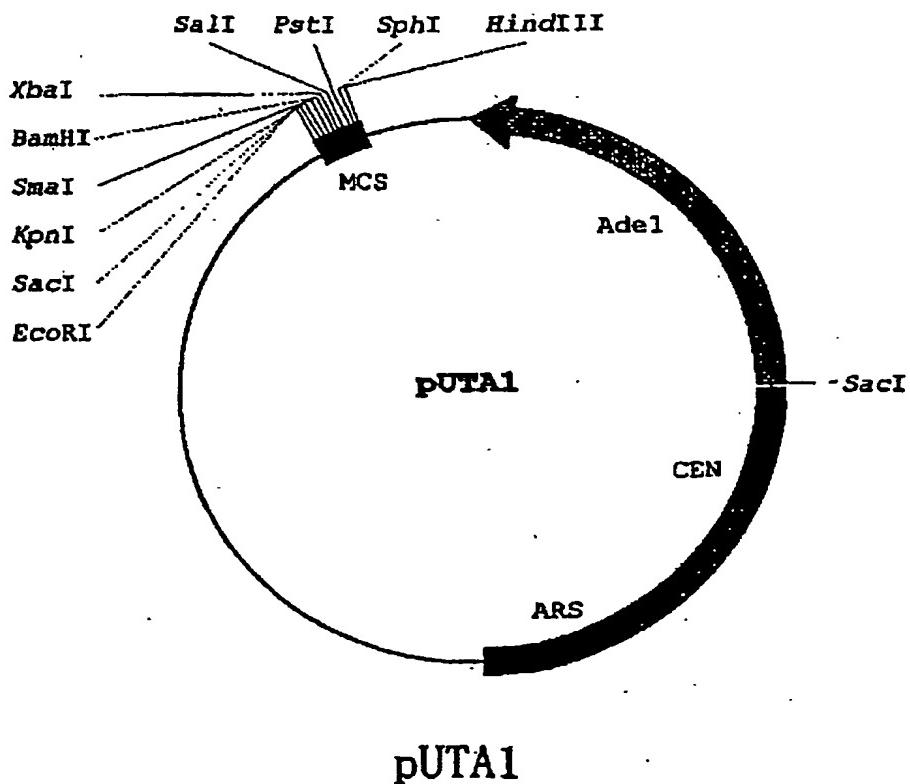


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/11

図 3

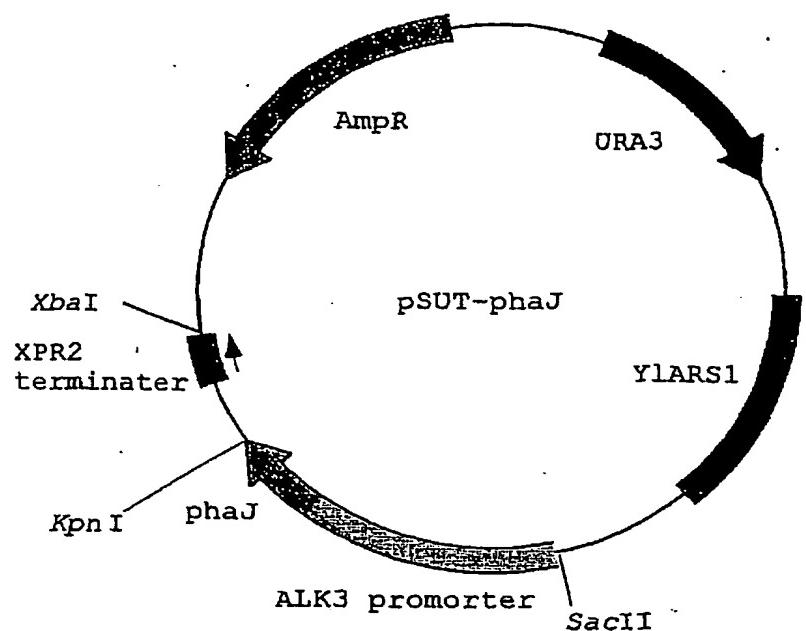
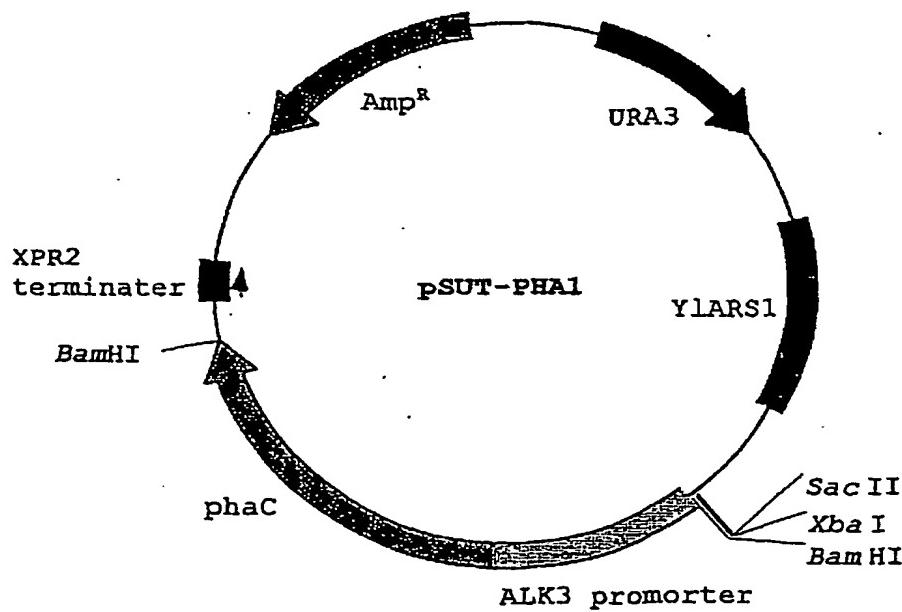


図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/11

図 5

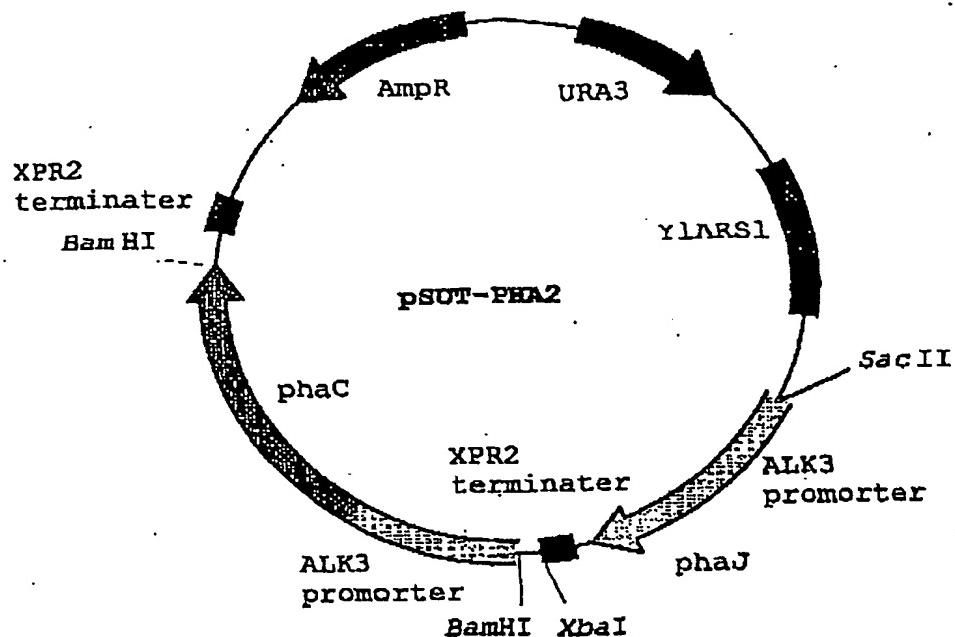
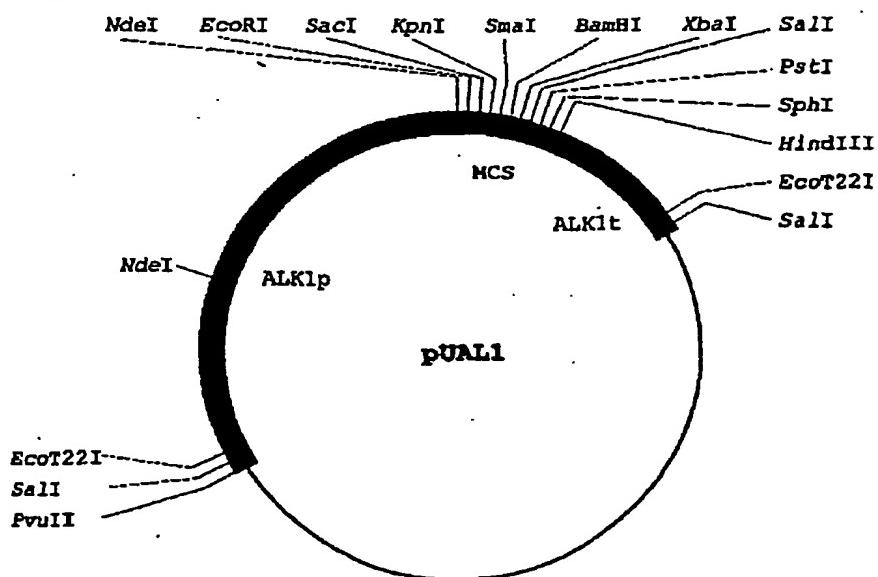


図 6

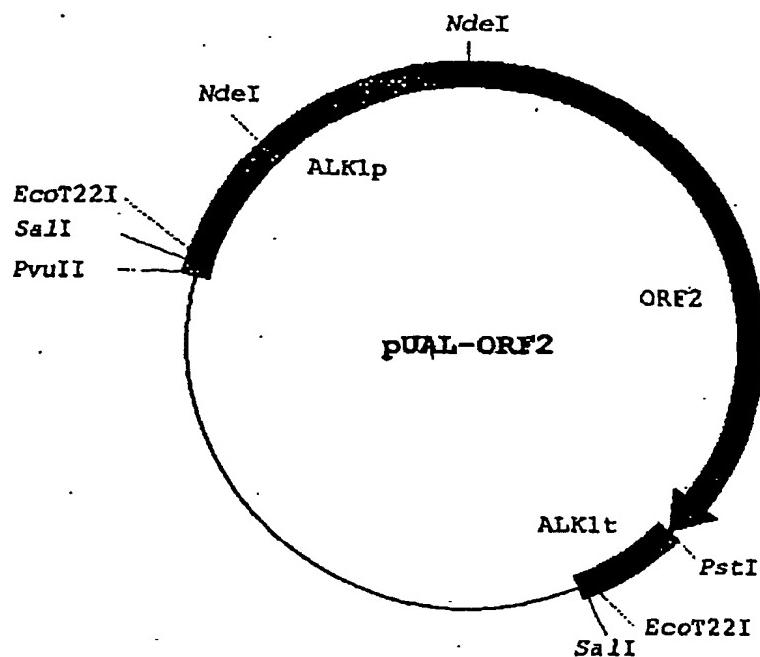


pUAL1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

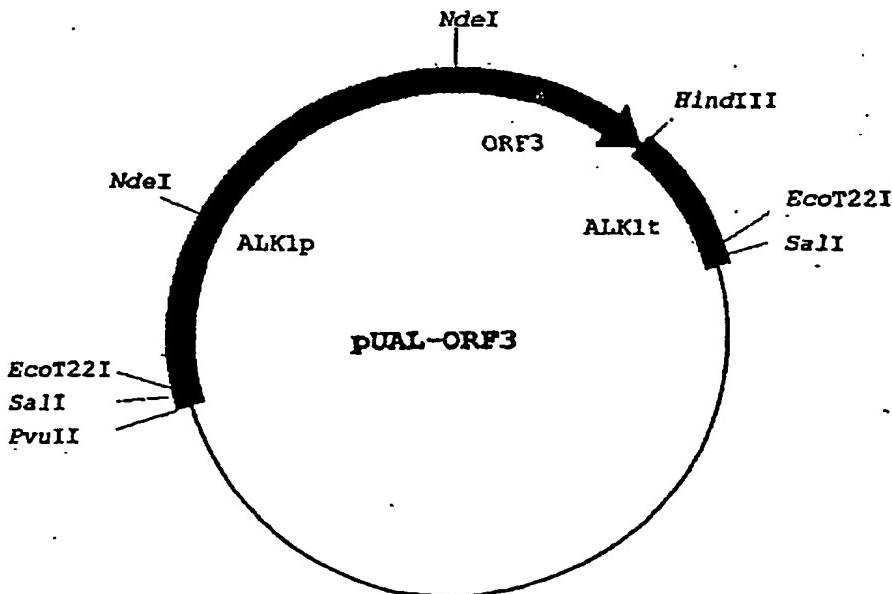
4/11

図 7



pUAL-ORF2

図 8

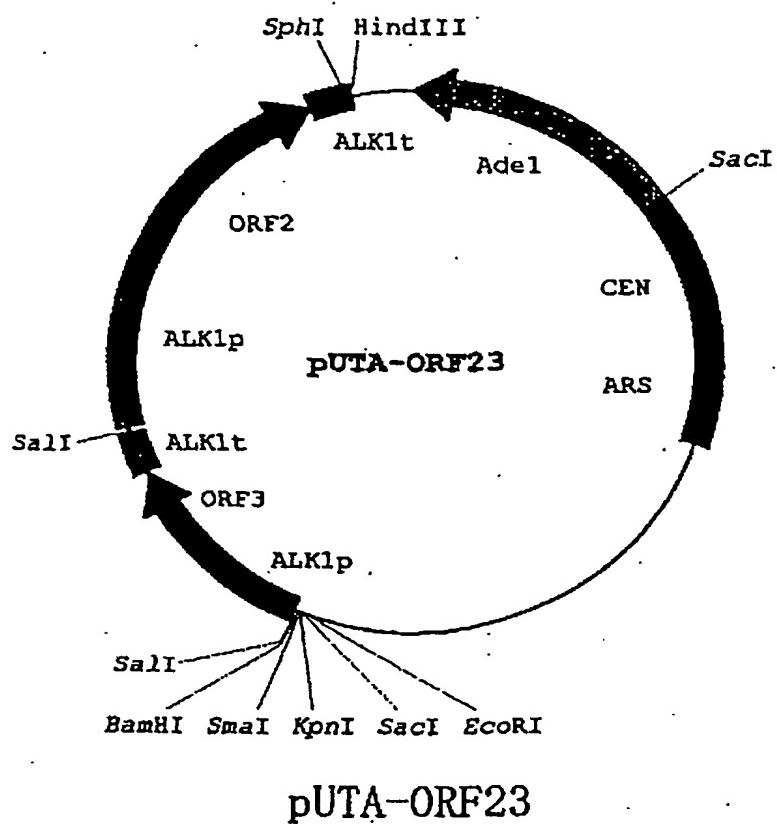


pUAL-ORF3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/11

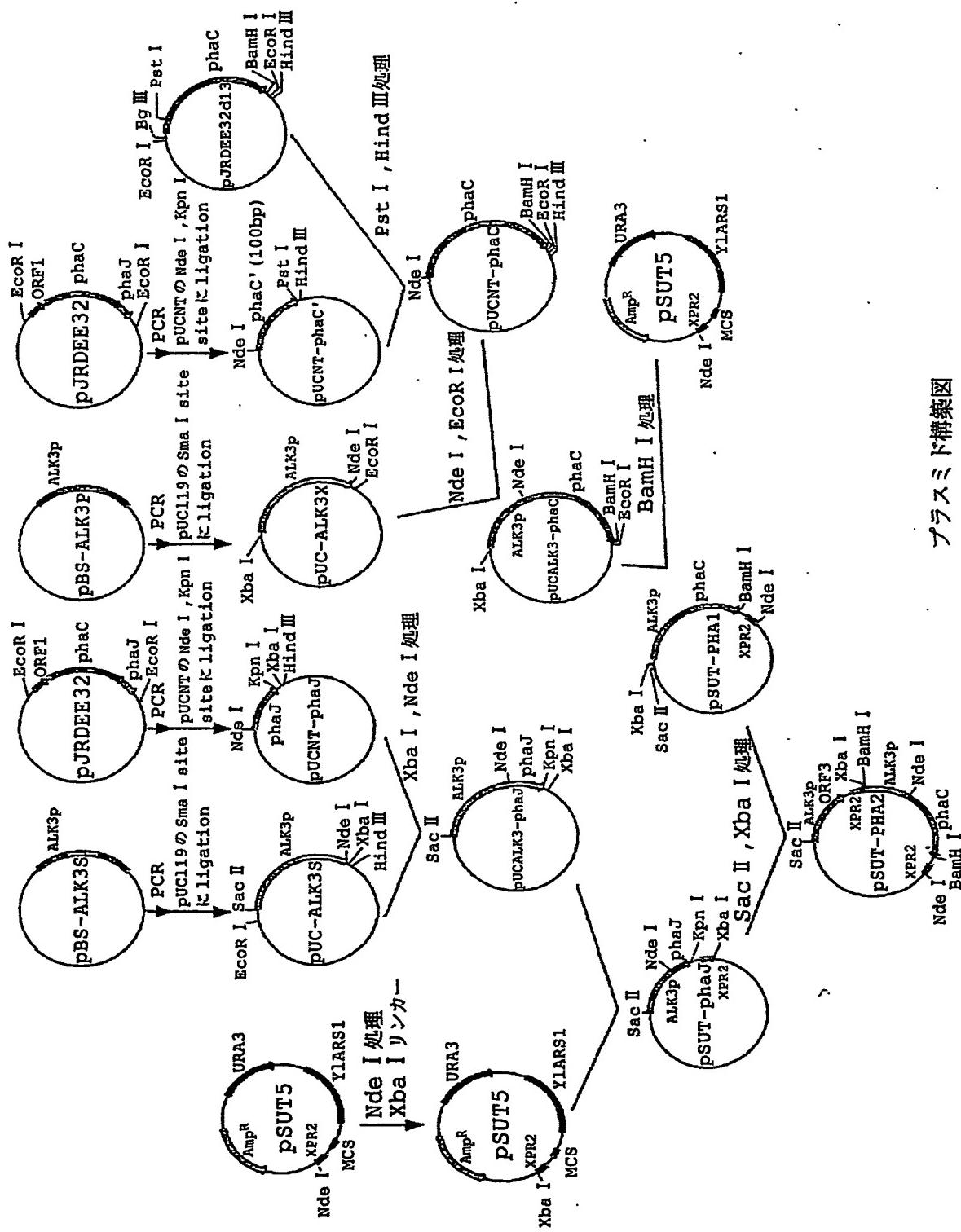
図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/11

図 1 O

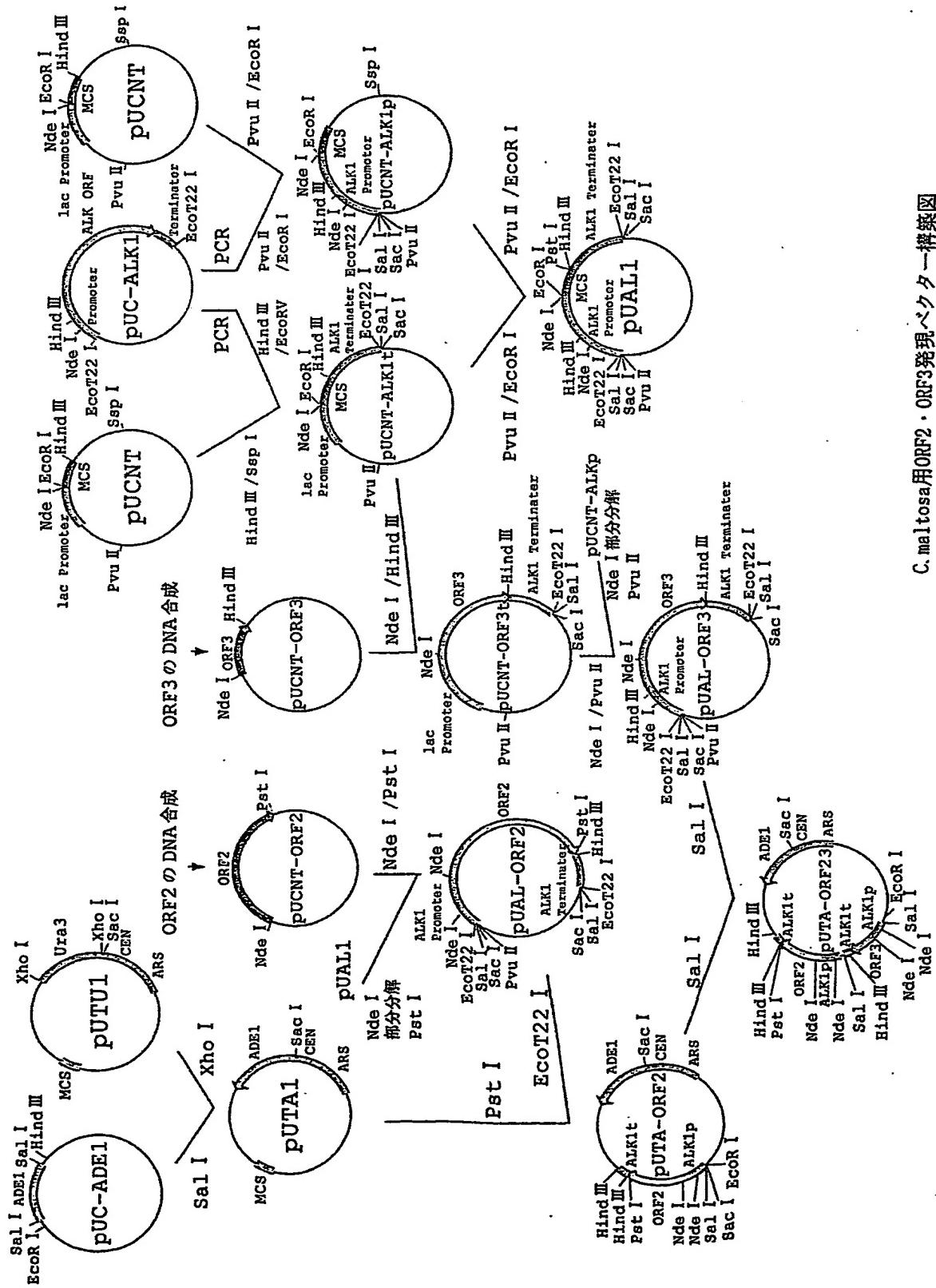


プラスミド構築図

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/11

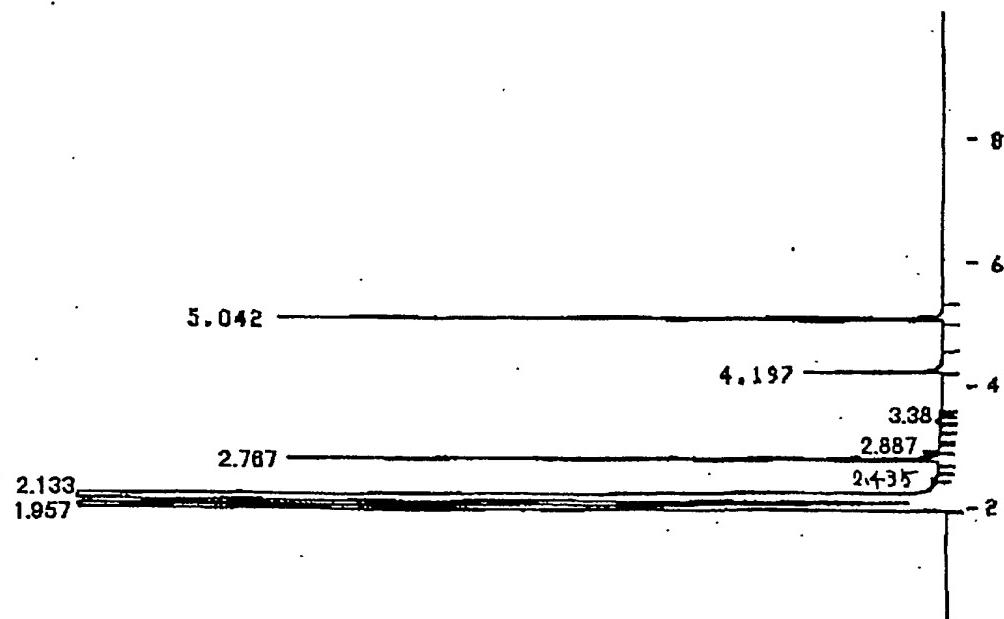
図 1 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/11

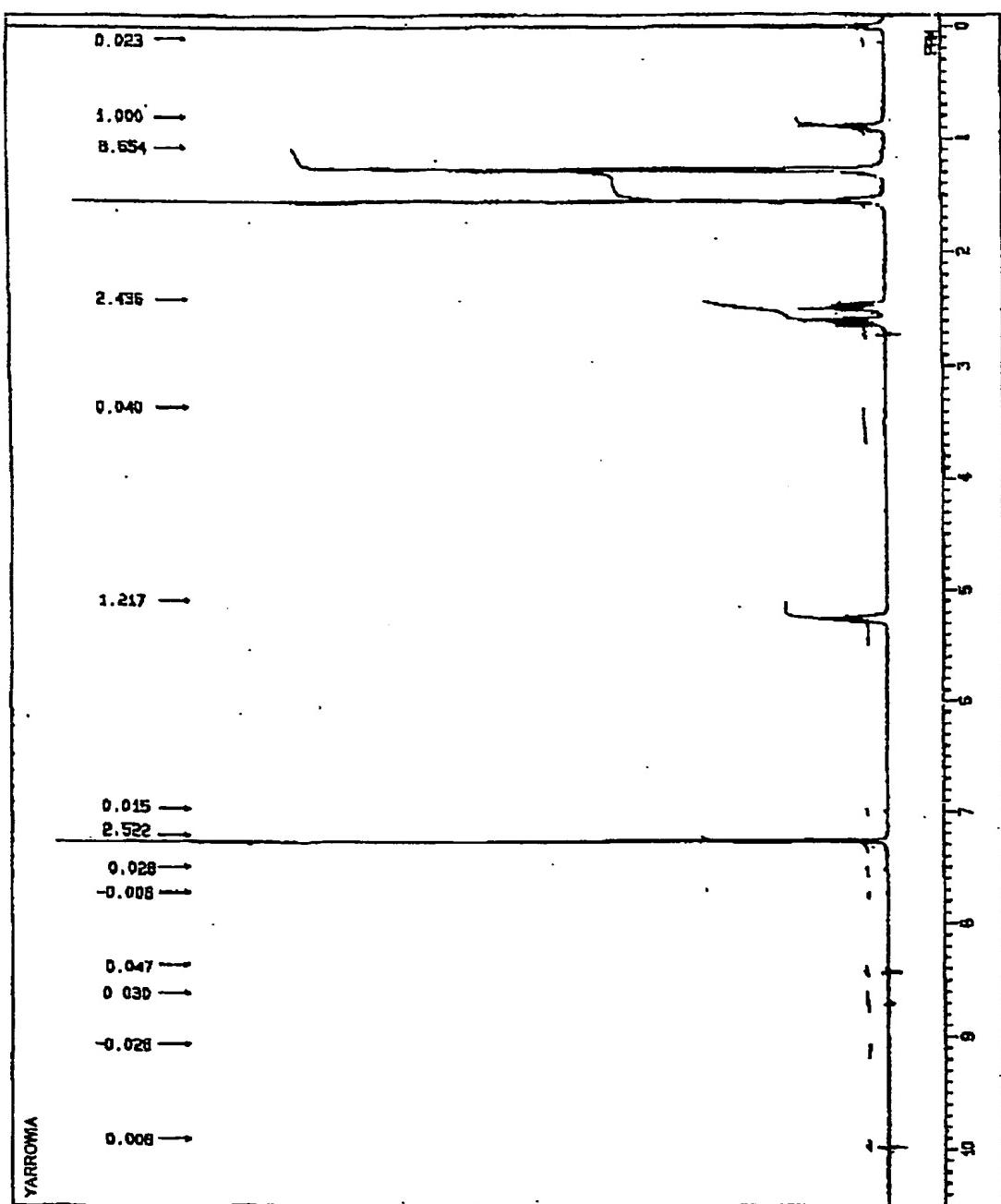
図 1 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/11

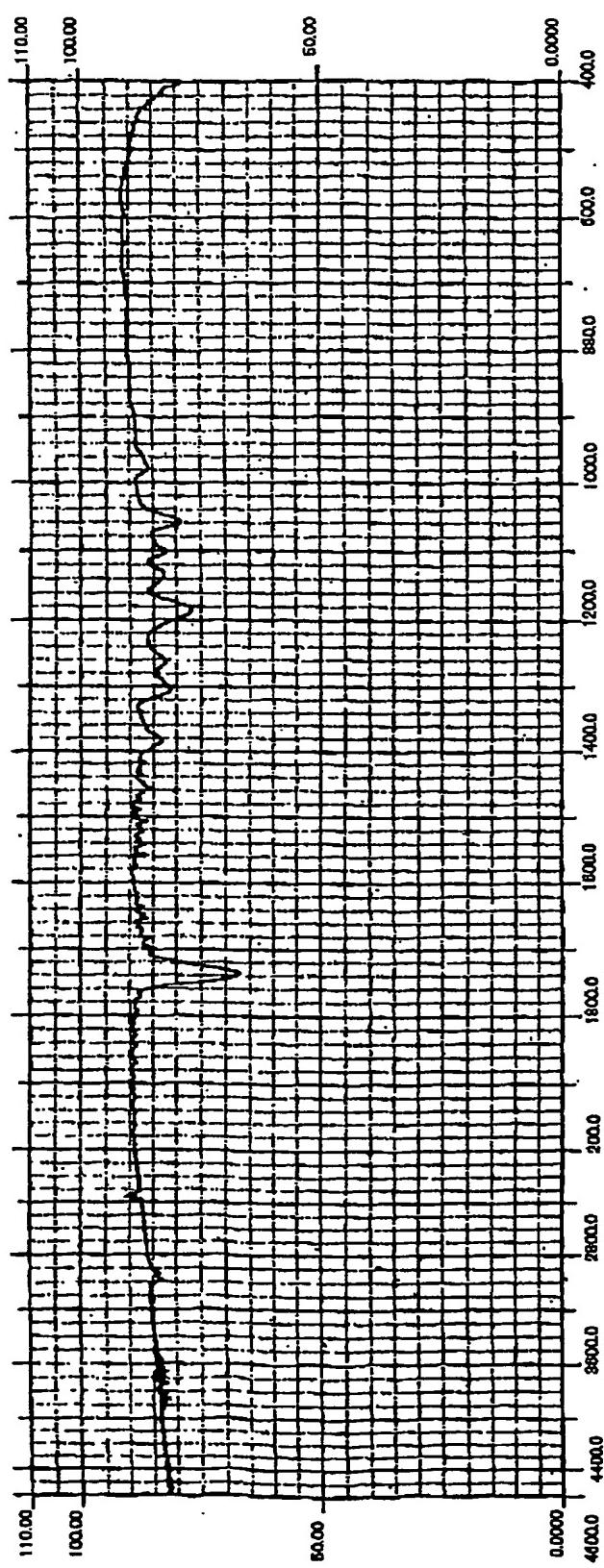
図 1 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/11

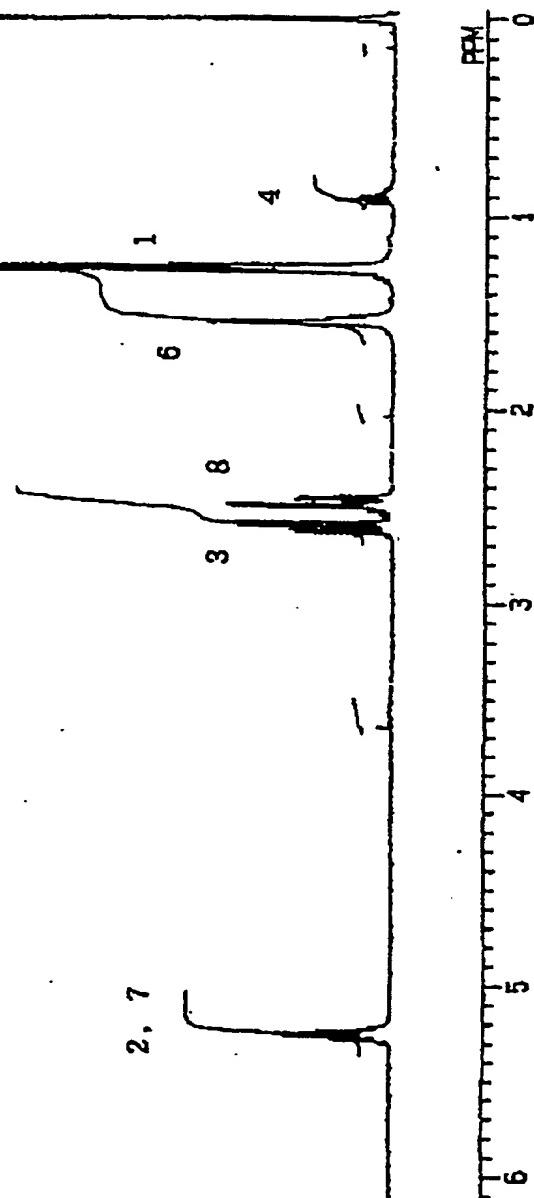
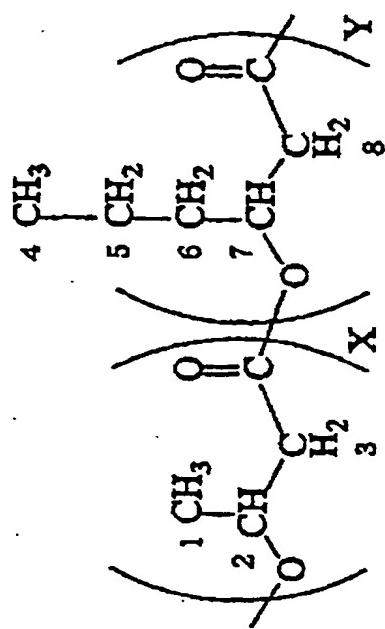
図 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/11

図 15



NMR 分析結果

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/18

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANAKA CORPORATION

<120> 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

<130> T-618

<160> 21

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Aeromonas caviae

<220>

<221> CDS

<222> 1..1785

<400> 1

atg	agc	caa	cca	tct	tat	ggc	ccg	ctg	ttc	gag	gcc	ctg	gcc	cac	tac	48
aat	gac	aag	ctg	ctg	gcc	atg	gcc	aag	gcc	cag	aca	gag	cgc	acc	gcc	96
cag	gcf	ctg	ctg	cag	acc	aat	ctg	gac	gat	ctg	ggc	cag	gtg	ctg	gag	144
cag	ggc	agc	cag	caa	ccc	tgg	cag	ctg	atc	cag	gcc	cag	atg	aac	tgg	192
tgg	cag	gat	cag	ctc	aag	ctg	atg	cag	cac	acc	ctg	ctc	aaa	agc	gca	240
ggc	cag	ccg	agc	gag	ccg	gtg	atc	acc	ccg	gag	cgc	agc	gat	cgc	cgc	288
ttc	aag	gcc	gag	gcc	tgg	agc	gaa	caa	ccc	atc	tat	gac	tac	ctc	aag	336
cag	tcc	tac	ctg	ctc	acc	gcc	agg	cac	ctg	ctg	gcc	tcg	gtg	gat	gcc	384
ctg	gag	ggc	gtc	ccc	cag	aag	agc	cgg	gag	cgg	ctg	cgt	ttc	ttc	acc	432
cgc	cag	tac	gtc	aac	gcc	atg	gcc	ccc	agc	aac	ttc	ctg	gcc	acc	aac	480
ccc	gag	ctg	ctc	aag	ctg	acc	ctg	gag	tcc	gac	ggc	cag	aac	ctg	gtg	528

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/18

cgc gga ctg gcc ctc ttg gcc gag gat ctg gag cgc agc gcc gat cag 576
ctc aac atc atc cgc ctg acc gac gaa tcc gcc ttc gag ctc ggg cgg gat - 624
ctg gcc ctg acc ccg ggc cgg gtg gtg cag cgc acc gag ctc tat gag 672
ctc att cag tac agc ccg act acc gag acg gtg ggc aag aca cct gtg 720
ctg ata gtg ccg ccc ttc atc aac aag tac tac atc atg gac atg cgg 768
ccc cag aac tcc ctg gtc gcc tgg ctg gtc gcc cag ggc cag acg gta 816
ttc atg atc tcc tgg cgc aac ccg ggc gtg gcc cag gcc caa atc gat 864
ctc gac gac tac gtg gtg gat ggc gtc atc gcc gcc ctg gac ggc gtg 912
gag gcg gcc acc ggc gag cgg gag gtg cac ggc atc ggc tac tgc atc 960
ggc ggc acc gcc ctg tcg ctc gcc atg ggc tgg ctg gcg gcg cgg cgc 1008
cag aag cag ccg gtg cgc acc gcc acc ctg ttc act acc ctg ctg gac 1056
ttc tcc cag ccc ggg gag ctt ggc atc ttc atc cac gag ccc atc ata 1104
gcg gcg ctc gag gcg caa aat gag gcc aag ggc atc atg gac ggg cgc 1152
cag ctg gcg gtc tcc ttc agc ctg ctg cgg gag aac agc ctc tac tgg 1200
aac tac tac atc gac agc tac ctc aag ggt cag agc ccg gtg gcc ttc 1248
gat ctg ctg cac tgg aac agc gac agc acc aat gtg gcg ggc aag acc 1296
cac aac agc ctg ctg cgc cgt ctc tac ctg gag aac cag ctg gtg aag 1344
ggg gag ctc aag atc cgc aac acc cgc atc gat ctc ggc aag gtg aag 1392
acc cct gtg ctg ctg gtg tcg gcg gtg gac gat cac atc gcc ctc tgg 1440
cag ggc acc tgg cag ggc atg aag ctg ttt ggc ggg gag cag cgc ttc 1448
ctc ctg gcg gag tcc ggc cac atc gcc ggc atc atc aac ccg ccg gcc 1536
gcc aac aag tac ggc ttc tgg cac aac ggg gcc gag gcc gag agc ccg 1584
gag agc tgg ctg gca ggg gcg acg cac cag ggc ggc tcc tgg tgg ccc 1632
gag atg atg ggc ttt atc cag aac cgt gac gaa ggg tca gag ccc gtc 1680
ccc gcg cgg gtc ccg gag gaa ggg ctg gcc ccc gcc ccc ggc cac tat 1728
gtc aag gtg cgg ctc aac ccc gtg ttt gcc tgc cca aca gag gag gac 1776
gcc gca tga 1785

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/18

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> Aeromonas caviae

<220>

<221> CDS

<222> 1..402

<400> 2

atg	agc	gca	caa	tcc	ctg	gaa	gta	ggc	cag	aag	gcc	cgt	ctc	agc	aag	48
cgg	ttc	ggg	gcg	gcg	gag	gta	gcc	gcc	ttc	gcc	gcg	ctc	tcg	gag	gac	96
ttc	aac	ccc	ctg	cac	ctg	gac	ccg	gcc	ttc	gcc	gcc	acc	acg	gcg	ttc	144
gag	cgg	ccc	ata	gtc	cac	ggc	atg	ctg	ctc	gcc	agc	ctc	ttc	tcc	ggg	192
ctg	ctg	ggc	cag	cag	ttg	ccg	ggc	aag	ggg	agc	atc	tat	ctg	ggt	caa	240
agc	ctc	agc	ttc	aag	ctg	ccg	gtc	ttt	gtc	ggg	gac	gag	gtg	acg	gcc	288
gag	gtg	gag	gtg	acc	gcc	ctt	cgc	gag	gac	aag	ccc	atc	gcc	acc	ctg	336
acc	acc	cgc	atc	ttc	acc	caa	ggc	ggc	gcc	ctc	gcc	gtg	acg	ggg	gaa	384
gcc	gtg	gtc	aag	ctg	cct	taa										405

<210>3

<211>1785

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>1..1785

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/18

<400>3

atg tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc gaa gct ttg gct cat tac 48
aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc gaa aga act gct 96
caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144
caa ggt tct caa caa cca tgg caa ttg att caa gct caa atg aat tgg 192
tgg caa gat caa tta aaa ttg atg caa cac act ttg tta aaa tct gct 240
ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288
ttt aaa gct gaa gct tgg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336
caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384
ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga aga ttg aga ttc ttt act 432
aga caa tac gtc aac gct atg gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480
cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528
aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576
tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624
ttg gct ttg act cca ggt aga gtt gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672
tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720
ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atg gat atg aga 768
cca caa aac tcc ttg gtc gct tgg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816
ttc atg att tcc tgg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864
tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912
gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac tgt att 960
ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atg ggt tgg ttg gcc gcc aga aga 1008
caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056
ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttt att cat gaa cca att atc 1104
gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atg gat ggt aga 1152
caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat tgg 1200
aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248
gat ttg ttg cac tgg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296
cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/18

ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392
act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440
caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488
tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536
gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584
gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632
gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680
cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728
gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776
gct gct taa 1785

<210>4

<211>405

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>1.. 405

<400> 4

atg tct gct caa tcc ttg gaa gtt ggt caa aaa gct aga tta tct aaa 48
aga ttc ggt gcc gcc gaa gtt gct gct ttt gct gcc tta tct gaa gat 96
ttc aac cca ttg cac ttg gat cca gct ttt gct gct act acc gcc ttc 144
gaa aga cca atc gtc cat ggt atg ttg tta gct tct tta ttt tcc ggt 192
ttg ttg ggt caa caa ttg cca ggt aaa ggt tct att tat ttg ggt caa 240
tct tta tct ttc aaa ttg cca gtc ttt gtc ggt gat gaa gtt acc gct 288
gaa gtt gaa gtt act gct ttg aga gaa gat aaa cca att gct act ttg 336
act act aga att ttc act caa ggt ggt gct tta gct gtt acc ggt gaa 384

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/18

gct gtt gtc aaa ttg cca taa 405

<210> 5

<211> 1036

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

5220

<223> promoter ALK3p

<400> 5

ctgcagcggc gagaccgggtt ctggccgac tacgacgtgc ctggagggac gctccggag	60
aatcttttgc acggggccaa gatctcccc gaccaccctg ccggacagta caagtggaa	120
gagggggagt ttcccttgac caagagtgc aagagtgaga acggcaatgg agtcaatgg	180
gatgagcccg ctactaagaa acaaaaaatc tgaacaagag ccggtttag tacatacaa	240
gagccggcac gtggacatgc agctgcctt cgaacatgaa gggagcacga ccccacgtat	300
cagtattatgc aaggggacca gaagtggcct cggcaaaaga ttggccicgg tcaacaaaag	360
gtcatcatat ccgtctccgc atccgtctgt acgtgaatta tgttacttgt atctttactg	420
tactggtttgc gagctacgtc gccaaactaat gccaaaccagt cctgtggtgt gtctataggt	480
atgttatatac agtacgagta aatgtatttgt actggcgcag cacagtagat gacggagacg	540
atgaatcggt caccacccac aaacattgcc tccaaacacc gttatattgt cttactgtcg	600
tggctgagac agactcctcg gggccttgc agagggggaa tgtgtgagac agatgcccac	660
aagtgaccat gcattttgtg gggcaggaga aaaaccaatg ttgtgggaa tagaaccat	720
caaataatgc taaatgaact ctcccaaaat gaaccactct cttccctccaa tcaaagccct	780
gcgaaatgtc ctccgtctgt ttctcgacc cttagccgtt cgcacccata ttacgatagc	840
ccgcccacccat aatgcgttta acttgcatgc atgcgtctgc atacagctgc atctgtcata	900
tatgcaccat ttccccacac aactgaagtt tatatatata tactgttaagg actcctgaag	960
tggcacgaac acacccgtatc acagcaacat tacagtgacac tactctgctc gtattttaca	1020
atactggacg aaaaatg	1036

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/18

<210>6

<211>1017

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<223>promoter ALK1p

<400>6

atgcatgaac aggatttaat cccaaagaaaa aagtctattt tctattttca caaggaaact 60
ggaaaaaacct ttttgtttt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaaaaa ataaattttg 120
aagatttgac ttgctgtatga aaatgctatc agttagtc tagacttgat actagactat 180
gatggcaaca catggggtc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240
aaaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattggtgt aaaaattggct 300
atttttggta ctttcctaat gggaaattta attgtttaaa attccagttt ttccagagtt 360
aagatttcga ccaatttattt ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaaa 420
taataatcga ggtacgttta atacgagata tttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480
ttcattgacg atcagaagct tgattggtaa ttccaggtgca tgtgtggata taaacccaac 540
aaattatcta gcaactgtgc cttccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaaa 600
atctggataa ataaatcatt catttcacat ttccggtaa gtataaggaa ttttaattt 660
ttttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtaa caatgtgctt tgtaacatgc 720
aggggatttt ctccgttgc gtttctcca catgctttta atgtgtataa aattaaaaaa 780
attacaaaga aaaaccggca tataaggcatc ggagttaca ttgttaacta actgcaaaat 840
ggcgatgttt caaatcaaca aaattaaaaa aaaccccaa aaaaaaagtat cataataatt 900
aaactcaaaa tccttttgat tgcataaaaat ttttaatct cttctttttt ttctttttta 960
cttcttatac tattctattc ttttttata tatctaattc attataaca tctggtc 1017

<210>7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/18

<211>218

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<223>terminator ALK1t

<400>7

atagatggat tttctttt tatgtgtatt tccggtaat aaatgttaa atttttttt 60
taataaaaaat atttgttagtt atttatatgc aaaaaaaaaa aatattcaaa gcaatcttc 120
tttcttctt tatcttccc ccatgctaag gtctaaaaca ccacaactta aaacccaact 180
taaccgtata atactaagat caatctccaa agatgcat

218

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

gctctagact gcagcggcga gaccggttct gg

32

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/18

<220>

<223> primer

<400> 9

ggacacatat gcgtccagta ttgtaaaata cgagc

35

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

tcccccgccgc tgcagcggcg agaccggttc tgg

33

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

ggacacatat gagccaacca tcttatggcc c

31

<210> 12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

cccagatcgt ccagattggc ctgcag

26

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 13

ggacacatat gagcgacaaa tccctggaag t

31

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/18

<400> 14

ggggtagctt aaggcagctt gaccacggc

29

<210>15

<211>46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>15

tttttcagct ggagctcgctc gacatgcattt aacaggattt aatccc

46

<210>16

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>16

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aatttagata

39

<210>17

<211>32

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/18

<220>

<223>primer

<400>17

cggaagctta tagatggatt tttctttttt at

32

c

<210>18

<211>45

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>18

ttttgatatac gagctcgatcg acatgcacatct ttggagattt atctt

45

<210> 19

<211> 5804

<212> DNA

<213> E.coli, Yarrowia lipolytica

<220>

<223> plasmid pSUT5

<400> 19

aggccattct cgttactgcc aaaacaccac ggtaatggc cagacaccat ggacgagttat 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/18

ctgtctgact cgtcattgcc gccttggag tacgactcca actatgagtg tgcttggatc 120
actttgacga tacattctc gtggaggct gtgggtctga cagctgcgtt ttccggcg 180
ttggccgaca acaatatcag ctgcaacgtc attgctggct ttcatacatga tcacatttt 240
gtcggcaaag gcgacgccc gagagccatt gagttcttt ctaatttggaa ccgatagccg 300
tatagtccag tctatctata agtcaacta actcgtaact attaccataa cataacttc 360
actgccccag ataagggtcc gataaaaaagt tctgcagact aaattttttt cagtctcc 420
ttcaccacca aaatgccctc ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc cgcccttgcc 480
gctcgagtgc tcaagctcgt ggcagccaag aaaaccaacc tgtgtcttc tctggatgtt 540
accaccacca aggagctcat tgagcttgc gataaggctcg gaccttatgt gtgcattatc 600
aagaccata tcgacatcat tgacgacttc acctacgccc gcactgtgct cccctcaag 660
gaacttgctc ttaagcacgg ttcttcctg ttcgaggaca gaaagttcgc agatattggc 720
aacactgtca agcaccagta caagaacggt gtctaccgaa tcgcccagtg gtccgatatc 780
accaacgccc acggtgtacc cggaaccgga atcattgctg gcctgcgagc tgggccgag 840
gaaactgtct ctgaacagaa gaaggaggac gtctctgact acgagaactc ccagtacaag 900
gagttcctgg tcccctctcc caacgagaag ctggccagag gtctgctcat gctggccgag 960
ctgtcttgca agggctctct ggccactggc gagtactcca agcagaccat tgagcttgc 1020
cgatccgacc ccgagttgt ggtggcttc attgcccaga accgaccaa gggcgactct 1080
gaggactggc ttattctgac ccccggggtg ggtcttgacg acaagggaga cgctctcgga 1140
cagcagtacc gaactgttga ggatgtcatg tctaccgaa cggatcat aattgtcg 1200
cgaggtctgt acggccagaa ccgagatctt attgaggagg ccaagcgata ccagaaggct 1260
ggctgggagg ctaccagaa gattaactgt tagaggttag actatggata tgtcattaa 1320
ctgtgtatat agagagcgtg caagtatgga gcgcttggc agcttgtatg atggtcagac 1380
gacctgtctg atcgagtatg tatgatactg cacaacctgt gtatccgcat gatctgtcca 1440
atggggcatg ttgttgttt tctcgatacg gagatgctgg gtacaagtag ctaatacgat 1500
tgaactactt atacttat gaggcttggaa gaaagctgac ttgtgtatga cttattctca 1560
actacatccc cagtcacaat accaccactg cactaccact acaccaaaaac catgatcaa 1620
ccacccatgg acttcctggaa ggcagaagaa ctgttatgg aaaagctcaa gagagagaag 1680
ccaagatact atcaagacat gtgtcgcaac ttcaaggagg accaagctct gtacaccgag 1740
aaacaggctt gctcgctgtt tcaggaact gttcgatggt tcggagagag tcgccc 1800

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/18

gaacatacgc gcaccgatgt cagcagacag cttattaca agtatattca agcaagtata 1860
tccgtagggt gcgggtgatt tggatctaag gttcgactc aacactcacg agcagcttgc. 1920
ctatgttaca tcctttatc agacataaca taattggagt ttacttacac acggggtgta 1980
cctgtattag caccacctac aattgttagca ctggacttg tacaaagaat ttattcgta 2040
aatcacagg gacggccgcc ctcaccgaac cagcgaatac ctcagcggtc ccctgcagtg 2100
actcaacaaa gcgatatgaa catcttgcga tggtatcctg ctgatagttt ttactgtaca 2160
aacacctgtg tagctccttc tagcattttt aagttattca cacctcaagg ggagggataa 2220
attaaataaa ttccaaaagc gaagatcgag aaactaaatt aaaattccaa aaacgaagtt 2280
ggaacacaac cccccgaaaaaaa aaaaacaacaa aaaaaaaaaacc caacaaaata aaaaaaaaaaca 2340
aaataaaat ataactacca gtatctgact aaaagttcaa atactcgta ttacaacaaa 2400
tagaaatgag ccggccaaaa ttctgcagaa aaaaatttca aacaagtact ggtataatta 2460
aattaaaaaa cacatcaaag tatcataacg ttagtttattt tattttattt aataaaagaa 2520
aacaacaaga tgggctcaaa acttcaact tatacgatac ataccaaata acaatttagt 2580
atttatctaa gtgctttcg tagataatgg aatacaaatg gatatccaga gtatacacat 2640
ggatagtata cactgacacg acaattctgt atctctttat gtttaactact gtgaggcatt 2700
aaatagagct tgatataataa aatgttacat ttcacagtct gaactttgc agattaccta 2760
atttggtaag atattaatta tgaactgaaa gttgatggca tccctaaatt tgatgaaaga 2820
tgaaattgta aatgaggtgg taaaagagct acagtcgtt tgggttgcgata taccatcatc 2880
tctaacgaaa tatctattaa aaatctcagt gtgatcatga gtcattgcca tcctggaaaa 2940
tgtcatcatg gctgatattt ctaactgtt acttggata aatatatatt tacaagaact 3000
tcccttgaaa ttaatttataa tataaaatgt ttgcggcaaa gttactacga ggaataaatt 3060
atatctgtt actagaagtt atgaacattc agtatataatg cacatataat aaccaacttc 3120
ggcccttcg tctcgcggt ttgggtgatg acggtaaaaa cctctgacac atgcagctcc 3180
cgagacggt cacagctgt ctgttaagcggt atgcggggag cagacaagcc cgtcagggcgc 3240
cgtcagcggt tggtggcggt tgctgggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 3300
tactgagagt gcaccatacg cgccatag ggcgaattgg agctccacccg cgggtggcgcc 3360
cgctctagaa ctagtggatc ccccggtcg caggaattcg atatcaagct tatcgatacc 3420
gtcgacctcg agggggggcc cggtaaccag cttttgtccc tgcgcgtat gcgggtgaa 3480
ataccgcaca gatgcgttaag gaaaaatac cgcatcaggc gctgcattaa tgaatcgcc 3540

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/18

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattt ggcgtcttc ctaggcaatt aacagatgt 3600
ttgccggta taattctttt aacctccac actccttga cataacgatt tatgtaacga 3660
aactgaaatt tgaccagata ttgttgtaaa tagaaaatct ggctttagg tggcaaaatc 3720
ccgtctttgt tcatcaattc cctctgtgac tactcgtcat cccttatgt tcgactgtcg 3780
tatttcttat ttccatatac tatgcaagtg agatgcccgt gtcctctcg ctcaactgact 3840
cgctgcgctc ggtcggtcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 3900
ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 3960
aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg 4020
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 4080
gataccaggc gttccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccc 4140
ttaccggata cctgtccgccc ttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct caatgctcac 4200
gctgttaggtt tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaaac 4260
cccccggtca gcccggaccgc tgccgcctt cggtaacta tcgttttgag tccaacccgg 4320
taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 4380
atgttaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagga 4440
cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct 4500
tttgatccgg caaacaaacc accgctggta ggggtggttt tttgtttgc aagcagcaga 4560
ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttagt ctttctacg gggtctgacg 4620
ctcagtgaa cggaaactca cgttaaggga tttggtcat gagattatca aaaaggatct 4680
tcaccttagat cttttaaat taaaaatgaa gttttaatc aatctaaagt atatatgagt 4740
aaacttggtc tgacagttac caatgcitaa tcagtggagc acctatctca gcgatctgtc 4800
tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgtt gataactacg atacgggagg 4860
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag 4920
atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt 4980
tatccgcctc catccagtct attaattgtt gcccggaaagc tagagtaagt agttcgccag 5040
ttaatagttt ggcgaacgtt gttgccattt ctacaggcat cgtgggtca cgctcgtcg 5100
ttggatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca tggatccccca 5160
tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg 5220
ccgcagtggtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttcttact gtcgtccat 5280

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16/18

ccgtaagatg ctttctgtg actggtagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt 5340
tgccgcgacc gagttgcctt tgcccgccgt caatacggga taataccgcg ccacatagca 5400
gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 5460
taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga ttttcagcat 5520
cttttacttt caccagcggtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa 5580
agggaataag ggcgacacgg aaatgtgaa tactcatact cttccctttt caatattatt 5640
gaagcatttta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa 5700
ataaaacaaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa 5760
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat cacg 5804

<210> 20

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker DNA

<400> 20

tactctagag 10

<210> 21

<211> 1820

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<221> CDS

<222> 538..1413

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/18

<223>Adel

<400>21

gatccccc ttcaaacc ttcaaacc ttcaaaccat tgtttcgtt ctctatgtt ggtatcggtt 60
cttccttc ttcaaaaaaa agggggggcac tattcaaaaa aaaatattat aacagtatga 120
ttttttccc tctcccgicg attgagggtt ttttttctc ttgcgtctg gtctttgct 180
tttcactcca aaaatggaaa cacgcgcggc tcaactcgaa atccgtgatc aaaaaaataa 240
aggctgtgag ttgcagcca ataattatga attagtgta ttttttaa agataaataa 300
tcaagaatcg cattagggag acgaatatgc gtattcaaa taaaaagaca attcittag 360
ggtagcatit cccttcaagt tcattccaca tgtacattaa tgtcaatgtat gcgcagaag 420
ttaaatttagc agaagaaaaa aaaaatgtga attactccga gtcaactctt ctttcttc 480
ttcttttct tctttatcac cataatcacc accaccacca ccaccacca ctcccgatg 540
acttcaacta acttagaagg aactttccca ttgattgcca aaggtaaagt cagagatatt 600
taccaagg tg acgacaacac tcttttattc gttgctactg atagaattc cgcatcgt 660
gtgattatgt ctaatggat cccaaataaa ggtaaaatct taaccaaattt gtcgtattc 720
tggtttgatt tcttgccat tgaaaaccat ttaatcaaag gagacattt ccaaaaat 780
cctcaactag aaccatatac aaaccaattt gaaggcagat ctttacttgt tagaaaattt 840
aaattgtatcc ctcttgaagt tattgttaga gggttacatca ccgggtccgg ctggaaagaa 900
taccaaaaat ctAAAaccgt ccacggattt cctattggtg atgiggtiga atcacaacaa 960
atcactccat tcttcacccc atccactaaa gcagaacaag gtgaacatga tgaaaatatc 1020
accaaagaac aagctgacaa gattgttggaa aaagaattat gtgatagaat tgaaaaattt 1080
gttattgatt tgtacaccaa agccagagat tacgctgcca ctaaaggaat tattatcgct 1140
gatactaaat ttgaatttgg tttagatggt gacaacatcg ttcttgcgttga cgaagttta 1200
actccagatt ctccagatt ctggaaatgtc gctaaatacg aagttggtaa atctcaagac 1260
tcttacgata aacaattttt gagagattgg ttaacttcta atgggttgc tggtaaagat 1320
ggtgttgcgtc tgcctgaaga cattgtcact gaaaccaaga gcaaatacg tgaagctac 1380
gaaaatttaa ctgggtgacaa atggcaagaa taaattaagg atatctttaa ttaaagctt 1440
ctatTTTatcc caaacttgc tagtattttc tgacatgttc agatgtttt actttatctt 1500
tcctgaaatt ttgatttct aaccgactct tgcatgtac tcttgataat gcaacatgt 1560

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18/18

cttgaccatt agcaaaaactt ctacctaaat ctatttgac tctgtccaaa gtttgacctt 1620
gagctttgtg gatcgacatc gcccacgaca agatcatttgg ttttgtttt atgggtgggtt 1680
attggcactt ggtgcaactg atggtaaac ttggaaagag gctaagaaat tgaagacttg 1740
aatatgaagaa cgtgcatacg attcaaattt gggtgaagaa ttgacttata cttgttataa 1800
aatgttatcat gatgttgatc

1820

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N 15/52, C12N 1/19, C12P 7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS/BIOSIS/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-108682 A (Rikagaku Kenkyusho), 28 April, 1998 (28.04.98), & EP 824148 A2 & US 5981257 A	1-23
X Y	Timothy A. Leaf et al., "Sarccharomyces cerevisiae expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate", Microbiology, (1996), Vol.142, No.5, pages 1169 to 1180	1 2-23
X Y	Toshiaki Fukui et al., "Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escherichia coli, FEMS Microbiology Letters, (1999), Vol.170, No.1, pages 69 to 75	1 2-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "B" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 August, 2001 (08.08.01)Date of mailing of the international search report
21 August, 2001 (21.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 15/52, C12N 1/19, C12P 7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-108682 A (理化学研究所) 28.4月.1998 (28.04.98) & EP 824148 A2 & US 5981257 A	1-23
X Y	Timothy A. Leaf et. al, Sarccharomyces cerevisiae expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. Microbiology, 1996, Vol. 142, No. 5, p. 1169-180	1 2-23

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.08.01

国際調査報告の発送日

21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

深草 亜子



4 B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Toshiaki Fukui et. al, Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters, 1999, Vol. 170, No. 1, p. 69-75	<u>1</u> <u>2-23</u>